

Aus dem Lehrstuhl Anatomie II – Neuroanatomie der Anatomischen Anstalt

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Univ. Prof. Dr. med. Christoph Schmitz

Der Einfluss zytoprotektiver Eigenschaften von Laquinimod auf periphere Immunzellrekrutierung in das Telencephalon

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christin Rebecca Reinbach

aus

Karlsruhe

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Univ. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Martin Kerschensteiner
PD Dr. Astrid Blaschek

Mitbetreuung durch
die promovierte Mitarbeiterin: Univ. Prof. Dr. Tanja Hochstrasser

Dekan: Univ. Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.2021

I. Inhaltsverzeichnis

II.	Abkürzungsverzeichnis	5
1	Einleitung	7
1.1	Die Multiple Sklerose	7
1.1.1	Relevanz der Erkrankung	7
1.1.2	Epidemiologie	7
1.1.3	Pathophysiologie	9
1.1.4	Verlaufsformen und Symptome	12
1.1.5	Diagnostik	13
1.1.6	Therapie	14
1.2	Laquinimod – Eine Therapieoption für RRMS & PPMS?	15
1.3	Die verwendeten Tiermodelle	17
1.4	Arbeitshypothesen	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Materialien und Chemikalien	21
2.1.1	Materialien für den Tierversuch	21
2.1.2	Materialien für die Gewebegewinnung	22
2.1.3	Materialien für die Immunhistochemischen Färbungen	22
2.2	Daten zu den Versuchstieren	24
2.3	Versuchsaufbau und Durchführung	25
2.3.1	Die Cuprizone-Fütterung	26
2.3.2	Die Medikamentengabe über eine Schlundsonde	27
2.3.3	Die EAE-Immunisierung	28
2.3.4	Das EAE-Scoring	29
2.3.5	Die Perfusion der Versuchstiere	30
2.4	Materialgewinnung Region 215, Region 265 und Rückenmark	32
2.5	Immunhistochemische Färbungen	34
2.5.1	Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Färbung	38
2.5.2	Luxol Fast Blue/PAS (LFB/PAS) Färbung	39
2.6	Auswertung	41
2.6.1	Untersuchte Hirnregionen	41
2.6.2	Beurteilung und Auswertung der einzelnen Versuche	42
2.7	Statische Darstellung und Auswertung	51

3	Ergebnisse	53
3.1	Vergleich der Kontroll-, Cup/Veh- und Cup/Laq-Gruppe	53
3.1.1	Luxol Fast Blue/PAS Färbung.....	53
3.1.2	Anti-PLP Färbung	57
3.1.3	Anti-IBA1 Färbung.....	59
3.1.4	Anti-MAC-3 Färbung	62
3.1.5	TSPO-Expression Messung im PET-CT	65
3.2	Vergleich der CupEAE/Veh- und CupEAE/Laq-Versuchsgruppe.....	67
3.2.1	Vergleich der klinischen Symptome.....	67
3.2.2	Inflamationsindex im Rückenmark	70
3.2.3	H.E. Färbung.....	71
3.2.4	Anti-CD4 Färbung.....	74
4	Diskussion	79
4.1	Einfluss der Laquinimod-Behandlung auf Neurodegeneration und Inflammation	79
4.1.1	Myelinisierung	79
4.1.2	Mikrogliaaktivierung	80
4.1.3	TSPO-Expression im PET-CT.....	81
4.1.4	Klinische Symptome und Inflamationsindex im Rückenmark	82
4.1.5	Perivaskuläre Inflammation und Rekrutierung von Immunzellen	83
4.1.6	Remyelinisierung	85
4.1.7	Klinische Studien von Laquinimod	85
4.2	Methodik	86
4.2.1	Einschränkung der MS Forschung und Ihrer Tiermodelle	86
4.2.2	Der Versuchsaufbau	89
4.2.3	Die Versuchsdurchführung.....	89
4.2.4	Die Auswertungsverfahren	89
5	Zusammenfassung.....	91
III.	Abbildungsverzeichnis	93
IV.	Tabellenverzeichnis	95
V.	Literaturverzeichnis	97
VI.	Eidesstattliche Erklärung.....	111
VII.	Danksagung.....	112

II. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
BDNF	engl. brain-derived neurotrophic factor
Bzw.	beziehungsweise
CD4	engl. Cluster of differentiation 4
CT	Computer-Tomographie
Cup	Cuprizone
DAB	Diaminobenzidin
DMT	engl. Disease Modifying Therapy
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDSS	engl. Expanded Disability Status Scale
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	Englisch
et al.	et alia
g	Gramm
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIER	engl. Heat induced epitope retrieval
HLA	engl. Human leukocyte antigen
IBA1	engl. Ionized calcium binding adaptor molecule 1
IgG	Immunglobulin G
l	Liter
Laq	Laquinimod
ICC	laterales Corpus callosum
LFB	engl. Luxol fast blue
MBP	Basisches Myelinprotein (engl. Myelin basic protein)
mCC	mediales Corpus callosum
mg	Milligramm
MHC	engl. Major Histocompatibility Complex

min	Minute
ml	Milliliter
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Protein
MRT	Magnetresonanztomografie
MS	Multiple Sklerose
NAGM	engl. Normal appearing grey matter
NAWM	engl. Normal appearing white matter
OR	engl. Odds-Ratio
PAS	Periodsäure-Schiff-Reaktion
PBS	Phosphatpufferlösung (engl. Phosphate buffered saline)
PET	Positron-Emissions-Tomographie
PLP	Proteolipid-Protein
PPMS	primär progrediente MS (engl. Primary progressive MS)
pScx	Primär Somatosensorischer Kortex
PTX	Pertussis Toxin
PVC	perivaskuläres Infiltrat (engl. Perivascular cuff)
ROI	engl. Region of interest
RRMS	schubförmig-remittierende MS (engl. Relapsing-remitting MS)
R215	Region 215 nach Sidman et al.
R265	Region 265 nach Sidman et al.
Sek	Sekunde
SEM	Standardfehler (engl. Standard Error of the Mean)
SPMS	sekundäre-progrediente MS (engl. Secondary-progressive MS)
Tab.	Tabelle
TMEV	Theiler-Murin-Enzephalomyelitis-Virus
Veh	Vehikel
ZNS	Zentrales Nervensystem
μl	Mikroliter

1 Einleitung

1.1 Die Multiple Sklerose

Multiple Sklerose (MS) ist eine chronische Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS) und zählt zu den häufigsten entzündlich neurologischen Erkrankungen bei jungen Erwachsenen. Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch fokale Läsionen in der weißen und grauen Substanz (Stadelmann et al., 2011, Kipp et al., 2012b). Das pathologische Korrelat zu diesen Läsionen sind Inflammation, Demyelinisierung, Mikrogliose, Astrogliose und axonaler Schaden (Ferguson et al., 1997, Benn et al., 2001, Bauer et al., 2001, Kipp et al., 2017).

1.1.1 Relevanz der Erkrankung

MS ist der häufigste Grund für nichttraumatische neurologische Defizite bei jungen Erwachsenen weltweit. Hauser et al. zeigten, dass etwa 50 % der Patienten nach einer mittleren Krankheitsdauer von 15 Jahren eine Gehhilfe benötigen, 70 % der MS Patienten in täglichen Aktivitäten eingeschränkt sind und 75 % nicht arbeitsfähig sind (Hauser and Oksenberg, 2006). Bei MS Patienten besteht allerdings eine nur leicht reduzierte Lebenserwartung, 88 % der Patienten überleben 40 Erkrankungsjahre. Weinshenker et al. veröffentlichten, dass nur 1,5 % der Patienten während des Beobachtungszeitraums an den Folgen ihrer Erkrankung verstarben (Weinshenker et al., 1989). Sadovnick et al. zeigten, dass viele MS Patienten unter Depressionen leiden, die bei 28,6 % der Patienten zu Selbstmord führten. Diese Suizidrate ist 7,5-fach so hoch wie in der gleichen Altersgruppe der Normalbevölkerung (Sadovnick et al., 1991). Daraus ergibt sich eine große medizinische, ökonomische und soziale Komponente der Erkrankung (Adelman et al., 2013).

1.1.2 Epidemiologie

Die Prävalenz von MS variiert deutlich in Abhängigkeit von genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren zwischen unterschiedlichen Regionen und Populationen (Abb. 1). Kurtzke et al. teilten Regionen mit niedriger Prävalenz ($< 5 / 100000$ Einwohner), mittlerer Prävalenz ($5 - 30 / 100000$ Einwohner) und hoher Prävalenz ($> 30 / 100000$ Einwohner) ein.

Kurtzke et al. zeigten zusätzlich, dass alle Regionen mit mittlerer und hoher Prävalenz an Orten mit weißer Population zu finden sind und die Prävalenzrate bei Menschen anderer Ethnien

deutlich geringer ist (Kurtzke, 1991). Europa, Nordamerika und Australien sind Gegenden mit hohen Prävalenzraten; die höchsten Raten in Europa wurden in Skandinavien und Großbritannien erhoben. Die niedrigste Prävalenz zeigte sich in Japan, China, Zentralafrika und Lateinamerika.

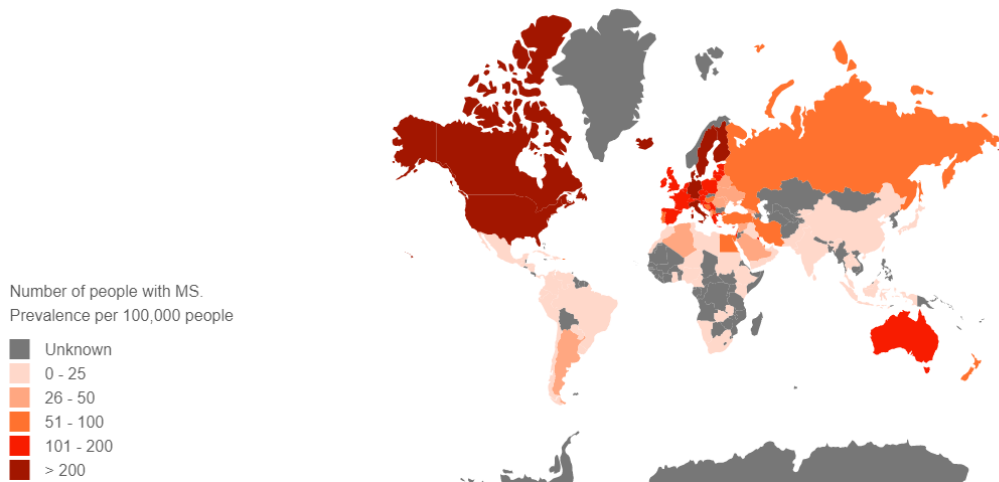


Abb. 1 „Multiple Sclerosis International Federation – Atlas of MS – 3rd Edition (September 2020).“ Mit Erlaubnis der Multiple Sclerosis International Federation (Federation, 2020).

Es ist bekannt, dass die Prävalenzraten einem Gradienten folgen, wobei die Erkrankung in Äquatornähe selten ist und in Richtung der Pole zunimmt (Browne et al., 2014). Folglich könnte eine geringere Sonnenlichtexposition bzw. ein geringerer Vitamin-D Spiegel Auswirkungen auf die Prävalenz von MS haben (Grant, 2006). Aus den Daten des MS Atlas zeigt sich, dass etwa die Hälfte der MS Erkrankten aus Europa stammt (Federation, 2020). In Deutschland beträgt die Prävalenz etwa 128/100.000 Einwohner und die Inzidenz 8/100.000 Einwohner/Jahr. Die Erkrankung wird weitaus häufiger beim weiblichen Geschlecht diagnostiziert (2-3:1) und manifestiert sich meist zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr (Fasbender and Kolmel, 2008, Poser et al., 1989, Kipp and Beyer, 2009).

Es wird vermutet, dass eine MS Erkrankung durch eine komplexe Wechselwirkung aus genetischer Prädisposition und verschiedenen Umweltfaktoren, wie Vitamin-D Konzentration, Infektionen, Nikotinexposition und Adipositas verursacht wird (Kucukali et al., 2015, Gourraud et al., 2012). Um den Einfluss der Umweltfaktoren zu untersuchen, wurden Migrationsstudien durchgeführt. Diese zeigten, dass die Migration von einem Land mit hoher Prävalenz in ein Land mit niedriger Prävalenz zu einer geringeren Erkrankungswahrscheinlichkeit führt. Andererseits führte eine Migration von Menschen in Länder mit hoher MS Prävalenz zu keinem Anstieg der Erkrankungswahrscheinlichkeit (Alter et al., 1962, Dean, 1967, Elian and Dean, 1993).

In Ländern mit hohen Prävalenzraten, wie Großbritannien und Schweden, wurden epidemiologisch-genetische Studien durchgeführt. Die schwedische Studie von Westerlind et al. zeigte, dass die Erkrankungswahrscheinlichkeit bei monozygoten Zwillingspartnern mit MS Erkrankung bei 17,2 % und bei dizygoten Zwillingspartnern bei 1,92 % liegt (Westerlind et al., 2014). Die genetische Prädisposition für MS ist mit den „Major Histocompatibility Complex“ (MHC) Genen, wie HLA-DRB1 und HLA-DQB, assoziiert (Lincoln et al., 2005, Oksenberg and Barcellos, 2005). Viele Gene dieser MHC-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung, Entwicklung und Reifung von T-Zellen sowie weiteren immunologischen Prozessen (Dyment et al., 2004).

Verschiedene Studien untersuchten den Zusammenhang zwischen Humanen Herpesviren, wie dem Epstein-Barr-Virus (EBV) und MS-Erkrankungen. Patienten, die im Jugendalter an infektiöser Mononukleose erkrankt waren, haben ein erhöhtes relatives Risiko MS zu entwickeln und MS-Patienten sind häufiger EBV-seropositiv als die Normalbevölkerung (Handel et al., 2010, Fernandez-Menendez et al., 2016, Fierz, 2017). Hedstrom et al. zeigten, dass Menschen, die mindestens einmal in ihrem Leben geraucht haben, ein zu 50 % erhöhtes Risiko haben, an MS zu erkranken (OR 1,50, 95 % KI [1,4 - 1,6], ****p < 10⁻³⁶) (Hedstrom et al., 2013). Diese genannten Prädilektionsfaktoren stellen nur einen kleinen Teil der komplexen Ursache der MS Pathologie dar.

1.1.3 Pathophysiologie

Das pathologische Korrelat der MS sind Plaques mit Verlust von Myelin, axonalem Schaden, Mikrogliose, Astrogliose und Inflammation. Die Prädilektionsstellen dieser demyelinisierenden Plaques sind der Nervus opticus, die periventrikuläre weiße Substanz, der Hirnstamm, das Kleinhirn und das Rückenmark; das periphere Nervensystem ist nicht betroffen. Die Plaques befinden sich meist in Nähe von mittelgroßen Gefäßen mit perivaskulären, wie auch diffus infiltrierenden Immunzellen (Kipp et al., 2012b, Noseworthy et al., 2000a, Stadelmann et al., 2011).

Die zwei Kennzeichen der Pathophysiologie der MS sind Inflammation und Neurodegeneration. Wie in Abb. 2 dargestellt wurde im Rahmen von Studien untersucht, ob die Autoimmunität oder die Neurodegeneration am Anfang der Pathogenese der MS steht (Oksenberg and Barcellos, 2005, Tsunoda and Fujinami, 2002, Stys et al., 2012). Einige Studien unterstützen die Hypothese, dass es primär durch eine Dysregulation des Immunsystems zur Migration von peripher getriggerten Myelin-reaktiven T-Zellen in den perivaskulären Raum

des ZNS kommt. Durch die Präsentation von Myelinfragmenten auf Antigen präsentierenden Zellen, kommt es zur Ausschüttung von Zytokinen sowie Chemokinen und folglich zur Aktivierung von residenten Mikrogliazellen und Erhöhung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke. Aktivierte Makrophagen und T-Zellen führen zum Abbau von Myelin und inflammatorischen Läsionen („Outside-In-Hypothese“) (Lucchinetti et al., 2000, Maggi et al., 2014, Frischer et al., 2009, Lassmann, 2018). Im Gegensatz dazu besagt die „Inside-Out-Hypothese“, dass es primär zu einer intrinsischen Zytodegeneration der Oligodendrozyten und des Myelins kommt. Durch die Apoptose der Oligodendrozyten werden autoantigene Fragmente wie basisches Myelinprotein (MBP) freigesetzt, welche sekundär eine Rekrutierung von Lymphozyten ins ZNS triggern (Barnett and Prineas, 2004, Trapp and Nave, 2008, Stys et al., 2012, Locatelli et al., 2012, Scheld et al., 2016, van Horssen et al., 2012, Baxi et al., 2015).

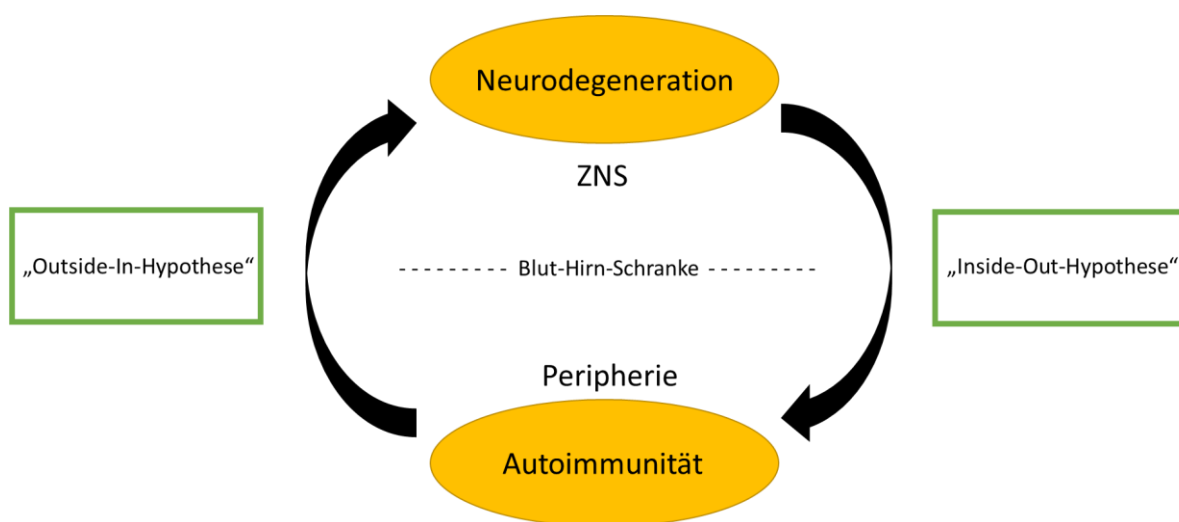


Abb. 2 Hypothesen über den Entstehungsmechanismus von MS; „Outside-In-Hypothese“ vs. „Inside-Out-Hypothese“. Abbildung modifiziert nach Stys et al. 2012.

In beiden Entstehungsmechanismen führen immunologische Prozesse in Form von einwandernden Immunzellen während der Erkrankung zu Gewebeschäden im ZNS. Es zeigte sich, dass CD8⁺-T-Zellen eine zentrale Rolle bei den immunologischen Reaktionen spielen (Mars et al., 2011, Jacobsen et al., 2002). Ein Zusammenspiel von zytotoxischen T-Zellen, Makrophagen, Komplementaktivierung, Verlust der Blut-Hirn-Schranke und freien Radikalen führt dann zu Inflammation. In der Magnetresonanztomographie (MRT) zeigen sich phagozytierende Makrophagen in Form von Gadolinium Anreicherung, Demyelinisierung in Form von T2-Hyperintensität und axonaler Schaden in Form von „black holes“ als T1-Hypointensität (Barkhof and van Walderveen, 1999, Galea Ingo, 2007).

Die weiße Substanz von MS Patienten enthält diffusen Gewebsschaden mit radiologischen und histologischen Auffälligkeiten. Sie wird in MS-Patienten als „normal appearing white matter“ (NAWM) bezeichnet (Allen and McKeown, 1979). Kernspintomografisch zeichnet sich die NAWM durch verminderte „Magnetization Transfer Ratio“ (MTR) (Demyelinisierung), vermehrte Wasseranreicherung (Ödeme) und vermindertem N-Acetylaspartat in der Spektroskopie (axonaler Schaden) aus (Barkhof and van Walderveen, 1999, Fu et al., 1998). Neuere Studien zeigten, dass neben der weißen Substanz auch die graue Substanz in kortikalen und subkortikalen Regionen von Demyelinisierung betroffen sind (Di Filippo et al., 2018, Kipp et al., 2012b, Schmierer et al., 2018, Lucchinetti et al., 2011, Geurts and Barkhof, 2008). Diese Läsionen in der grauen Substanz sind aufgrund ihrer geringen Größe und niedrigem Kontrast zur „normal appearing grey matter“ (NAGM) schwierig in konventionellen MRT-Sequenzen (T2 und FLAIR) zu identifizieren (Seewann et al., 2011, Nelson et al., 2008, Filippi et al., 2019). Fisher et al. und Agosta et al. zeigten, dass Läsionen in der grauen Substanz mehr mit dem Fortschreiten der körperlichen Behinderung und kognitiven Einschränkungen korrelieren als Läsionen in der weißen Substanz (Fisher et al., 2008, Agosta et al., 2006). Kortikale Atrophie wurde in frühen Krankheitsstadien beschrieben (Dalton et al., 2004) und findet möglicherweise unabhängig von Pathologien in der weißen Substanz und Inflammation durch Leukozyten (Bo et al., 2003) statt. Diese Beobachtungen könnten daraufhin weisen, dass in manchen Fällen die frühesten pathologischen Vorgänge in der kortikalen grauen Substanz konzentriert sind und diese den inflammatorischen Prozess triggern (Pirko et al., 2007, Kutzelnigg and Lassmann, 2005).

ZNS Läsionen werden über verschiedene MS Klassifikationssysteme, wie zum Beispiel das Bö/Trapp System, das De Groot/van der Valk System, das Lucchinetti/Lassmann/Brück System und das Vienna Konsensus System, eingeteilt (Bo et al., 1994, van der Valk and De Groot, 2000, Lucchinetti et al., 2000). Die neuste Klassifikation von Kuhlmann et al. berücksichtigt das Vorhandensein/Fehlen und die Verteilung von Makrophagen/Mikrogliazellen (Inflammation) sowie das Vorhandensein/Fehlen von akuter Demyelinisierung. Es werden aktive, gemischt aktive/inaktive und inaktive Läsionen unterschieden. Aktive und gemischt aktive/inaktive Läsionen können weiter in demyelinisierende Läsionen mit akuter Myelinzerstörung (basisches Myelinpeptid (MBP) und Proteolipid-Protein (PLP) im Zytoplasma von Makrophagen) und post-demyelinisierende Läsionen mit stattgefundener Myelinzerstörung (kein MBP und PLP im Zytoplasma von Makrophagen) eingeteilt werden. Läsionen mit vermehrter perivenöser und parenchymaler Infiltration von CD68⁺-T-Zellen und Mikrogliazellen bzw. schaumzelligen Makrophagen durch die komplette Läsion werden als

aktive Läsionen bezeichnet. Am häufigsten werden aktive Läsionen in Patienten mit neu diagnostizierter MS-Erkrankung und/oder in Patienten mit schubförmig-remittierender MS (RRMS) beobachtet. Gemischt aktive/inaktive Läsionen kennzeichnen sich durch ein hypozelluläres Läsionszentrum und viele aktivierte Mikrogliazellen im Randsaum der Läsion. Diese Läsionstypen sind häufig bei Patienten mit einem Krankheitsverlauf von mindestens zehn Jahren oder einem sekundär progressiven Krankheitsverlauf zu finden. Inaktive Läsionen kennzeichnen sich durch ein hypozelluläres Bild mit wenigen T-Zellen und Mikrogliazellen. Diese Läsionen zeigen sich in Patienten mit einem Krankheitsverlauf über mindestens 15 Jahren und in Patienten mit einem sekundär progressiven Krankheitsverlauf ohne Krankheitsschübe (Kuhlmann et al., 2017).

In den vergangenen Jahren wurde vermehrt eine Korrelation zwischen axonalem Schaden in Form von Gehirnatrophie und hypointensen T1-gewichteten MRT Läsionen und dem Grad des neurologischen Defizits bei MS Erkrankten beobachtet (Grimaud et al., 1999). Eine frühere Studie von Kuhlmann et al. zeigte, dass axonaler Schaden in frühen MS Läsionen häufig ist und im Laufe der Krankheit abnimmt. Potentiell axonprotektive Therapien während frühen Krankheitsstadien wirken sich positiv auf den Krankheitsverlauf aus (Kuhlmann et al., 2002). Prineas et al. detektierten dünn PLP- und MBP-positiv myelinisierte Axone mit kurzen Internodien in aktiven MS Läsionen. Dadurch wurde die Hypothese aufgestellt, dass Remyelinisierung in frühen akuten MS Läsionen stattfindet (Prineas et al., 1993). Goldschmidt et al. untersuchten 52 MS Biopsien (frühe MS Läsionen) und 174 Läsionen von 36 Autopsien (chronische MS Läsionen). Es zeigte sich, dass Remyelinisierung signifikant häufiger in frühen MS Läsionen als in späten MS Läsionen stattfindet (80,7 % vs. 60 %) (Goldschmidt et al., 2009).

1.1.4 Verlaufsformen und Symptome

Je nach Lokalisation und Größe der entzündlichen Läsion kommt es durch eine gestörte Erregungsleitung der Neurone zu unterschiedlichen klinischen Symptomen, die das variable Krankheitsbild der MS prägen. Prädilektionsstellen für entzündliche Läsionen sind Rückenmark, Kleinhirn, Hirnstamm sowie das juxtakortikale und periventrikuläre Marklager, welche zu sensorischen, motorischen, autonomen oder kognitiven Defiziten führen können (Noseworthy et al., 2000a, Confavreux and Vukusic, 2006). Die Erkrankung kann sich in benignen und malignen Verlaufsformen manifestieren, somit ist der individuelle Verlauf nicht vorhersehbar (Disanto et al., 2010, Zettl et al., 2012).

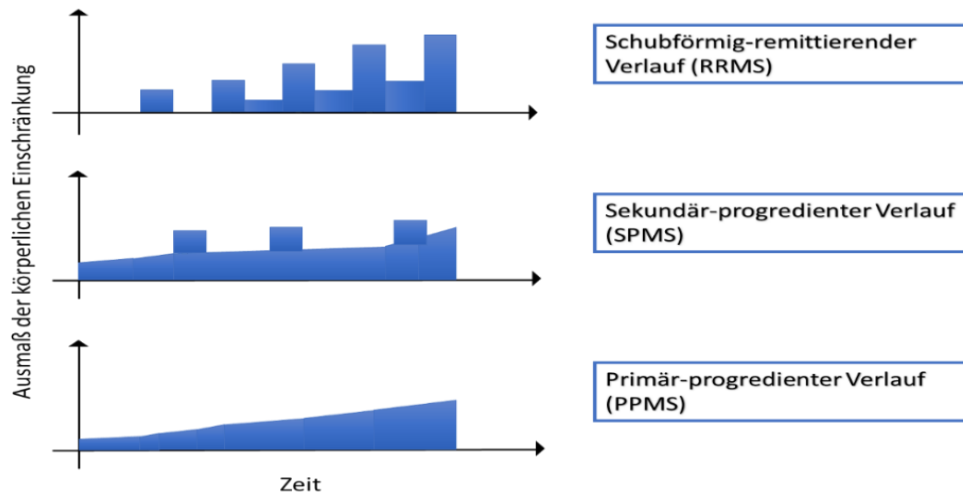


Abb. 3 Klinische Verlaufsformen von MS. Abbildung modifiziert nach Lublin et al. 1996.

Die Erkrankung beginnt häufig mit dem Auftreten von Doppelbildern, Augenmotilitätsstörungen, Sensibilitätsstörungen, Schwäche einer Extremität oder Ataxie. Diese initialen klinischen Symptome, die nicht die diagnostischen Kriterien der MS erfüllen, werden als klinisch isoliertes Syndrom bezeichnet. Wie Abb. 3 zeigt, werden insgesamt drei Verlaufsformen unterschieden: RRMS, SPMS & PPMS (Lublin and Reingold, 1996). Bei 85 % der MS Patienten manifestiert sich die Erkrankung am Anfang in Form von Schüben neurologischer Defizite, die sich anfangs meist komplett und im späteren Verlauf nur noch teilweise zurückbilden (RRMS). Bei einem Großteil dieser Patienten geht der schubförmig-remittierende Verlauf in einen sekundär-progredienten Verlauf mit chronisch schleichender Verschlechterung der Symptome über (SPMS). Bei 15 % der MS Patienten manifestiert sich die Erkrankung primär progredient mit einer schleichenden Progression der neurologischen Defizite ohne erkennbare Krankheitsschübe (PPMS) (Hauser and Oksenberg, 2006, Kutzelnigg et al., 2005, Lublin et al., 2014). Es gibt Hinweise darauf, dass akute inflammatorische Läsionen das Gegenstück zu klinischen Schüben (RRMS) sind und chronisch diffuse Neurodegeneration in Progression des neurologischen Defizits (SPMS & PPMS) resultiert (Geurts and Barkhof, 2008).

1.1.5 Diagnostik

Das internationale Gremium der MS Diagnose veröffentlichte 2001 die McDonald Kriterien als einheitliches Diagnosesystem. Um diese Kriterien zu erfüllen, muss eine räumliche und zeitliche Dissemination von Entzündungsherden vorliegen. Eine klinisch stumme Läsion liegt bei einem radiologischen Entzündungsherd ohne klinisches Korrelat vor (McDonald et al.,

2001). Die neuste Überarbeitung der McDonald Kriterien integriert die Bestimmung der intrathekalen IgG Synthese im Liquor (Thompson et al., 2018). Die positiven oligoklonalen Banden werden als zusätzliche zeitliche Dissemination gewertet und ermöglichen eine frühe Diagnosestellung (Schwenkenbecher et al., 2019). Da die immunmodulierenden Therapien in der Frühphase einer RRMS die größte Wirkung erzielen und in der Lage sind, frühe neurologische Defizite und Krankheitsschübe zu reduzieren, ist eine frühe Diagnosestellung der RRMS von großer prognostischer Relevanz (Comi et al., 2009, Goodin et al., 2002).

Zu den weiteren diagnostischen Mitteln zählen die neurologische Untersuchung, die elektrophysiologische Untersuchung von visuell evozierten Potenzialen und die Beurteilung von Läsionen in T2-gewichteten MRT Bildgebungen. Der Schweregrad der Behinderung wird mit dem von Kurtzke et al. entwickelten „Expanded Disability Status Scale“ (EDSS) angegeben. Die Ermittlung des Grades (0 - 10) erfolgt durch die Untersuchung von sieben funktionellen Systemen (FS): Hirnstamm, Kleinhirn, Sensorium, Pyramidenbahn, Blasen- und Mastdarmfunktionen, zerebrale Funktionen und Sehfunktionen (Kurtzke, 1983).

1.1.6 Therapie

Die Therapie der MS ist abhängig von der Verlaufsform des individuellen Patienten. Grundsätzlich lässt sich eine Schubtherapie mit Corticosteroiden, eine immunmodulatorische Therapie und supportive Therapie mit physikalischer Medizin und Physiotherapie unterscheiden (Jacobs LD, 2001, Tubridy et al., 1999). Im Anfangsstadium der Erkrankung profitieren Patienten von einer immunmodulatorischen Therapie, die das periphere Immunsystem beeinflusst und so zu verminderter Schubfrequenz führt (Derfuss et al., 2020, Boster et al., 2017, Gholamzad et al., 2019).

Bei fortgeschrittenen MS Stadien werden die neurologischen Defizite durch irreversiblen axonalen Schaden, lokale Entzündung des ZNS und chronische Aktivierung des angeborenen Immunsystems hervorgerufen. Die Inflammation durch die Einschwemmung von peripheren Immunzellen spielt in progressiven Krankheitsstadien eine geringere Rolle (Weiner, 2008). Diese Annahme wird durch den fehlenden Therapieeffekt von immunmodulatorischen Medikamenten in progressiven MS Stadien bestärkt (Compston and Coles, 2008). In diesen progressiven Krankheitsstadien gibt es bis heute nur unzureichend effektive Therapien (Panitch et al., 2004, Kapoor et al., 2018, Shirani et al., 2016). Eine aktuelle Studie von Kappos et al. zeigte erstmals einen signifikanten Effekt eines Immunmodulators auf progressive Krankheitsstadien (Kappos et al., 2018).

1.2 Laquinimod – Eine Therapieoption für RRMS & PPMS?

Laquinimod gehört zu den „disease modifying therapies“ (DMTs), die in vier Untergruppen eingeteilt werden: (1) Inhibierung der Immunzelleinwanderung [Natalizumab, Fingolimod], (2) Immunzellzerstörung [Alemtuzumab, Rituximab, Ocrelizumab], (3) Beeinflussung der Immunzellfunktion [Laquinimod, BG-12, Daclizumab], (4) Hemmung der Immunzellreplikation [Mitoxantron, Teriflunomid] (Bruck et al., 2013).

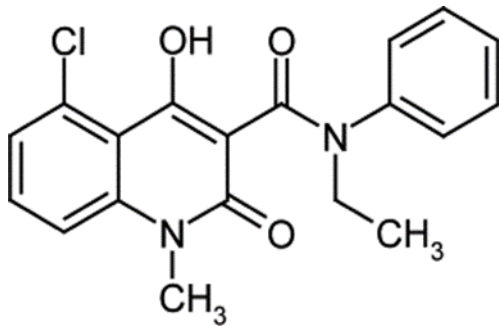


Abb. 4 Strukturformel von Laquinimod (Brunmark et al., 2002).
N-ethyl-N-phenyl-5-chlor-1,2-dihydro-4-hydroxy-1-methyl-2-oxo-3-quinoline-carboxamid.

Laquinimod, ABR-215062, ist ein oraler Immunmodulator im klinischen Test zur Therapie von RRMS und PPMS (Abb. 4). Das Molekül besitzt eine lineare Pharmakokinetik mit hoher Plasmaproteinbindung (> 98 %), hohe Bioverfügbarkeit (80-90 %), eine Halbwertszeit von 80 Stunden und die Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Laquinimod wird hauptsächlich von Zytochrom P450 3A4 metabolisiert und induziert Zytochrom P450 1A2 (Bruck and Wegner, 2011, Varrin-Doyer et al., 2014). Die Struktur von Laquinimod ist eine Weiterentwicklung des oralen Immunmodulators Roquinimex, welcher antiinflammatorische Effekte in experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE) und in klinischen Studien zeigte. Die weitere klinische Forschung an Roquinimex wurde aufgrund von toxischen Wirkungen auf das kardiovaskuläre und pulmonale System eingestellt (Noseworthy et al., 2000b).

In präklinischen Studien führte Laquinimod einerseits zur Minimierung toxischer Demyelinisierung (Bruck et al., 2012, Kramann et al., 2016), Reduktion von Mikrogliaaktivierung (Mishra et al., 2014) und Verhinderung der Inflammation im EAE-Modell (Brunmark et al., 2002, Wegner et al., 2010, Schulze-Topphoff et al., 2012, Jolivel et al., 2013, Kaye et al., 2016, Varrin-Doyer et al., 2016, Yang et al., 2004). Andere Autoren beschrieben einen immunmodulatorischen Effekt von Laquinimod auf die exzitatorische und inhibitorische synaptische Erregungsleitung (Ruffini et al., 2013) und einen positiven Einfluss auf Remyelinisierung in EAE (Moore et al., 2013). Ob eine durch Laquinimod reduzierte

Demyelinisierung sekundär zu weniger Immunzelleinwanderung führt, wurde noch nicht untersucht.

In zwei multizentrischen, randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten Phase II Studien führte eine tägliche Einnahme von Laquinimod (0,6 mg) zur Reduktion aktiver MRT-Läsionen bei RRMS (Comi et al., 2008, Polman et al., 2005). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden zwei multizentrische, randomisierte, doppelblinde, placebokontrollierte Phase III Studien (ALLEGRO & BRAVO) durchgeführt. In die Studien aufgenommen wurden 1988 Patienten (Laquinimod: n = 983; Placebo: n = 1005) mit RRMS (Comi et al., 2012, Vollmer et al., 2014).

In der ALLEGRO-Studie (engl. Assessment of Oral Laquinimod in Preventing Progression in Multiple Sclerosis) zeigte sich, dass die tägliche orale Einnahme von Laquinimod (0,6 mg) über 24 Monate verglichen mit der Einnahme von Placebo zu einer geringeren kumulativen Anzahl an Gadolinium aufnehmenden und neuen oder größenprogredienten MRT T2 gewichteten Läsionen führt (1.33 ± 0.14 vs. 2.12 ± 0.22 und 5.03 ± 0.08 vs. 7.14 ± 0.07 ; *** $p < 0.001$ für beide Versuche). In Patienten mit Laquinimod-Behandlung wurde eine verminderte Schubrate (0.30 ± 0.02 vs. 0.39 ± 0.03 , ** $p = 0.002$) und eine verlangsamte Progression des neurologischen Defizits (11.1 % vs. 15.7 %; hazard ratio 0.64) festgestellt (Comi et al., 2012).

Die BRAVO-Studie (engl. Benefit-Risk Assessment of Avonex and Laquinimod) randomisierte (1:1:1) 1331 Patienten mit RRMS im Alter von 18 - 55 Jahre in drei Gruppen (tägliche 0,6 mg Laquinimod-Gabe [n = 434], tägliche Placebo Gabe [n = 450] und wöchentliche IFN β -1a IM 30 μ g Gabe [n = 447]). Die Studie untersuchte vier spezifische Endpunkte; die Progression der Schubrate, den Grad des neurologischen Defizits gemessen mit dem EDSS, die Veränderung des Gehirnvolumens und Progression bzw. Neubildung von MRT-Läsionen. Die Schubrate der Patienten mit Laquinimod-Behandlung war im Vergleich zur Placebogruppe nicht signifikant vermindert (0,28 vs. 0,34, risk ratio (RR)= 0,82, $p = 0,075$). Die Laquinimod-Behandlung führte zu einem deutlich reduzierten Risiko eine Verschlechterung der Invalidität (Cox Proportions Hazard Model, 3 Monate Behandlung: -31,3 %, $p = 0,063$, 6 Monate Behandlung: -40,6 %, * $p = 0,042$) zu erleiden. Die kumulative Anzahl an MRT Läsionen wurde durch eine Laquinimod-Behandlung nicht signifikant verändert. Die tägliche Laquinimod-Therapie verminderte die Reduktion des Gehirnvolumens vs. Placebo signifikant (-28 %, *** $p < 0,001$). Im Gegensatz dazu beeinflusste eine Therapie mit IFN β -1a nicht eindeutig das Gehirnvolumen der Patienten im Vergleich zu Placebo (Vollmer et al., 2014).

Die ALLEGRO und BRAVO Studie zeigten, dass Laquinimod verglichen mit Placebo zu signifikant weniger Verlust an Gehirnvolumen führt. Da Gehirnatrophie mit dem Fortschreiten der klinischen Behinderung korreliert, wird vermutet, dass Laquinimod abgesehen von der anti-inflammatorischen Wirkung auch einen Effekt auf irreversible Gewebeschäden im ZNS hat. Filippi et al. zeigten mit speziellen MRT Untersuchungen, dass Laquinimod irreversible Gewebeschäden beispielsweise im Thalamus, reduziert. Dies weist auf einen direkten neuroprotektiven Effekt von Laquinimod hin und könnte die Ursache für den positiven Effekt auf das Fortschreiten der körperlichen Behinderung sein (Filippi et al., 2014).

Sorensen et al. untersuchte das Sicherheitsprofil von Laquinimod vs. Placebo in der BRAVO und ALLEGRO Studie. Insgesamt wurde Laquinimod mit benignen Nebenwirkungen, wie Kopfschmerzen und Appendizitis, ein gutes Sicherheitsprofil zugeschrieben (Sorensen et al., 2017, Varrin-Doyer et al., 2014).

Zuletzt verzeichnete Laquinimod nicht nur in MS Versuchen positive Effekte, sondern auch in Versuchen anderer Autoimmunerkrankungen, wie Lupus Nephritis (Lourenco et al., 2014), Autoimmunneuritis (Pitarokoili et al., 2014) und Colitis (Sun et al., 2016). Studien von Garcia-Marseille et al. bestätigten den neuroprotektiven Effekt einer Laquinimod-Behandlung auf die Demyelinisierung in einem Huntington Mausmodell (Garcia-Miralles et al., 2019). Katsumoto et al. zeigten, dass Laquinimod in einem Mausmodell mit traumatischer ZNS Schädigung eine Erweiterung des Ventrikel Systems vorbeugt sowie axonalen Schaden und posttraumatische Immunzelleinwanderung reduziert (Katsumoto et al., 2018).

1.3 Die verwendeten Tiermodelle

Um den Einfluss von Laquinimod auf Neurodegeneration und Rekrutierung von Immunzellen zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche MS-Tiermodelle verwendet: Das Cuprizone-Modell und das EAE-Modell. Die Kombination dieser zwei MS-Tiermodelle wird als CupEAE-Modell bezeichnet (Ruther et al., 2017, Scheld et al., 2016).

Das Cuprizone-Modell ist ein toxisches MS-Tiermodell. Es eignet sich zur Untersuchung von gehirnintrinsischer Neurodegeneration und Remyelinisierung (Stidworthy et al., 2003). Die Cuprizone-Intoxikation führt zu telencephalen Läsionen, die durch Oligodendrozytenapoptose, Demyelinisierung, Mikrogliose, Astrozytose und akuten axonalen Schaden gekennzeichnet sind (angeborene Immunität) (Norkute et al., 2009, Kipp et al., 2009, Skripuletz et al., 2011, Carlton, 1967). Diese toxische Demyelinisierung ist reproduzierbar und tritt im Bereich des medialen Corpus callosums (mCC) (Hiremath et al., 1998), des Pedunculus

cerebellaris superior (Torkildsen et al., 2008), des Cerebellums (Skripuletz et al., 2010), des Hippocampus (Norkute et al., 2009) und der Basalganglien (Pott et al., 2009) auf. Nach einer fünfwöchigen Cuprizone-Intoxikation ist die aktive Demyelinisierung maximal und nach Absetzen des Cuprizones folgen Remyelinisierungsvorgänge (Morell et al., 1998, Kipp et al., 2009). Eine Cuprizone-Intoxikation von 12 Wochen induziert eine chronische Demyelinisierung und führt nicht oder nur teilweise zu Remyelinisierung (Ludwin, 1980, Lindner et al., 2009).

Die EAE ist im Gegensatz zum Cuprizone-Modell ein immunologisches MS-Tiermodell und eignet sich zur Erforschung der autoimmunen Komponente der MS Pathologie (Baxter, 2007, Kipp et al., 2017). Eine Immunisierung der Versuchstiere mit Myelinpeptiden (MOG, PLP, MBP) führt zur Aktivierung von antigen-spezifischen T-Zellen aus sekundär lymphatischen Organen. Diese autoreaktiven T-Zellen überwinden die Blut-Hirn-Schranke und führen zu inflammatorischen Läsionen im Cerebellum und Rückenmark (adaptive Immunität). Histologisch zeigen sich in der EAE perivaskuläre T-Zellinfiltrate und sekundäre Demyelinisierung (Trotter et al., 1987, Mix et al., 2008). Das EAE-Modell bildet einige Aspekte der „Outside-In-Hypothese“ (Vgl. Abb. 2) ab und ist ein wichtiger Bestandteil bei der Entwicklung von DMTs (Steinman and Zamvil, 2006, Wekerle, 2008).

In klinischen MS-Studien zeigte sich, dass Entzündungsherde und ZNS Atrophie der MS-Patienten vor allem im Prosencephalon, Mesencephalon und Rhombencephalon zu finden sind. Im Gegensatz dazu entstehen die entzündlichen Läsionen im klassischen EAE-Mausmodell hauptsächlich im Cerebellum und im Rückenmark; das Großhirn ist selten betroffen. Unsere Arbeitsgruppe und andere Forschungsteams konnten zeigen, dass diese klinisch-präklinische Diskrepanz der Läsionslokalisation durch die Kombination des Cuprizone- und des EAE-Modells reduziert wird. Die primäre Cuprizone-induzierte Degeneration der Oligodendrozyten führt nach MOG₃₅₋₅₅-Immunisierung zur Einwanderung von peripheren Immunzellen ins Telencephalon (Scheld et al., 2016, Baxi et al., 2015, Ruther et al., 2017, Chrzanowski et al., 2019, Yakimov et al., 2019). Weiter spiegelt das CupEAE-Modell wichtige Aspekte der „Inside-Out-Hypothese“ wider (Vgl. Abb. 2). Die Kombination dieser zwei Modelle führt zu einer genaueren Abbildung der MS-Pathogenese und kann folglich ein Vorteil für die Untersuchung von Therapieeffekten sein.

1.4 Arbeitshypothesen

In dieser Dissertation wird die Wirkung von Laquinimod im Cuprizone- und CupEAE-Modell untersucht. Aufgrund des neuroprotektiven Effekts von Laquinimod in präklinischen und klinischen Studien (Brunmark et al., 2002, Bruck et al., 2012, Mishra et al., 2014, Varrin-Doyer et al., 2016, Polman et al., 2005, Comi et al., 2012), wurden folgende Arbeitshypothesen aufgestellt:

- Eine Laquinimod-Behandlung führt zur Protektion von Oligodendrozyten und folglich zu verminderter Demyelinisierung im Cuprizone-Modell.
- Eine Laquinimod-Behandlung führt zur Verminderung der Mikrogliose und Astrozytose im Cuprizone- und CupEAE-Modell.
- Die Reduktion der Mikrogliose und Astrozytose kann in vivo mittels Bestimmung der TSPO-Expression im PET-CT gezeigt werden.
- Dieser neuroprotektive Effekt auf den Untergang von Oligodendrozyten und die Aktivierung von Mikrogliazellen führt sekundär zur Reduktion von perivaskulärer Inflammation, Immunzellrekrutierung und Fortschreiten der Hirnläsionen im CupEAE-Modell.
- Die sekundäre Reduktion der Inflammation wird nicht durch den immunsuppressiven Effekt von Laquinimod hervorgerufen.

2 Material und Methoden

In diesem Kapitel sind die verwendeten Materialien mit Hersteller und Bestellnummer aufgelistet (Tab. 1, 2, 3). Darauf folgt eine Erläuterung des Tierversuchs, der Materialgewinnung und der angewendeten Immunhistochemischen Färbungen.

2.1 Materialien und Chemikalien

In den folgenden drei Unterkapiteln sind alle verwendeten Materialien für den Tierversuch, die Materialgewinnung und die Immunhistochemische Färbung aufgelistet.

2.1.1 Materialien für den Tierversuch

Tab. 1 listet die verwendeten Materialien (Hersteller, Bestellnummer) auf, die für die Haltung und Behandlung der Versuchstiere nötig waren.

Tab. 1 Verwendete Materialien für den Tierversuch

Materialien/Chemikalien	Hersteller	Bestellnummer
1 ml Spritzen soft ject	Henke Sass Wolf GmbH, Tuttlingen, Deutschland	5010-200V0
Cuprizone (Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazon)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	C9012
Doppelt destilliertes Wasser	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA	10977035
Gemahlenes Futter	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland	V1530-00
Haltungsfutter (Pellets)	Ssniff Spezialdiäten GmbH	V1534-300
Hooke Kit™ CFA Emulsion PTX	Hooke Laboratories, Lawrence, USA	Lot 1004
Hooke Kit™ MOG ₃₅₋₅₅	Hooke Laboratories	Lot 0122
Maus Wildtyp Stamm C57BL/6J	JANVIER LABS, Saint-Berthevin Cedex, Frankreich	000664
Laquinimod	TEVA Pharmaceutical Industries Ltd, Petach Tikwa, Israel	650421612
Kult X Küchenmaschine 1000 W	WMF Group, Geislingen, Deutschland	-
Tierhäuschen	Plexx BV, Elst, Niederlande	-
Tierkäfig SEALSAFE® NEXT BlueLine (1285L - TYP II L)	Tecniplast GmbH, Hohen Peißenberg, Deutschland	1284L00SUV

2.1.2 Materialien für die Gewebegewinnung

In Tab. 2 sind die Materialien für die Gewebegewinnung aufgelistet.

Tab. 2 Verwendete Materialien für die Gewebegewinnung

Materialien/Chemikalien	Hersteller	Bestellnummer
Deckgläser 24 x 40 mm	VWR Chemicals, Darmstadt, Deutschland	631-1573
Dinatriumhydrogenphosphat (wasserfrei)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland	1.06580.1000
Einbettkassette	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland	47-1150-00
Ethanol 100 %	Merck Millipore	1.00983
Formaldehyd 37 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	P733.2
Ketamin 10 %	Medistar	-
Natriumdihydrogenphosphat – Monohydrat	Merck Millipore	106346.1000
Natronlauge	Carl Roth GmbH	K021.1
Objektträger SuperFrost® Plus	VWR Chemicals	631-0108
Paraffin	Merck Millipore	K46815058603
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Merck (Biochrome)	L-182-50
Safety- Multifly- Kanüle	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland	85.1637.235
Salzsäure	Roth/Merck	K025.1/1.09057
Schlittenmikrotom	Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland	SM2000R
Xylazin 2 %	Ceva Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf, Deutschland	-
Xylol	Merck Millipore	28975.462

Ketamin-Xylazin-Lösung: Für 9,5 ml Ketamin-Xylazin-Lösung wurden 100 µl 2 %iges Xylazin und 400 µl 10 %iges Ketamin mit 9 ml NaCl vermischt.

2.1.3 Materialien für die Immunhistochemischen Färbungen

Tab. 3 listet die Materialien auf, die für die Immunhistochemische Färbung der Hirnschnitte verwendet wurden.

Tab. 3 Verwendete Materialien für die Immunhistochemische Färbungen

Materialien/Chemikalien	Hersteller	Bestellnummer
3,3-Diaminobenzidin (DAB)+Chromogen	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark	K3468
3,3-Diaminobenzidin (DAB)+ Substrat	Dako Denmark A/S	K3468
Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat	Merck Millipore	1.01042
DePeX Mounting medium	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	18243.02
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Fluka, St. Gallen, Schweiz	03685
Elite ABC-Kit	Linaris Biologische Produkte GmbH, Dossenheim, Deutschland	PK-6100
Eosin	Merck Millipore	15935
Essigsäure 100 %	Merck Millipore	1.00063.1000
Ethanol 100 %	Merck Millipore	1.00983
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich	H3136-25G
Litiumcarbonat	Merck Millipore	5671.0250
Luxol Fast Blue MBS	Chroma #M146-F	1328-51-4
Natriumiodat	Merck Millipore	6525
Normales Ziegenserum	Vector	S-1000
PBS Dulbecco-Pulver ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	Merck (Biochrom), Darmstadt, Deutschland	L-182-50
Perjodsäure	Merck Millipore	1.00524
Schiffs Reagenz	Sigma Aldrich	3952016
Tris (Pufferan®)	Carl Roth GmbH & Co. KG	4855.2
Wasserstoffperoxid 30 % (H_2O_2)	Carl Roth GmbH & Co. KG	8070.4
Xylol	VWR Chemicals	28975.462
Zitronensäure Monohydrat	Merck Millipore	1.00244.0500

Blockserum (1:20): Um 50 ml Blocking Serum herzustellen, wurden 2,5 ml normales Ziegenserum mit 47,5 ml Phosphatpufferlösung (PBS) gemischt.

DAB-Komplex (1:50): Für den DAB-Komplex wurden 980 µl DAB-Substrat mit 20 µl DAB-Stock gemischt.

Hämatoxylin-Lösung: Zur Herstellung der Stammlösung wurden 1 g Hämatoxylin in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst und 200 mg Natriumiodat und 50 g Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat hinzugefügt. Zur Stammlösung wurden 50 g Chloralhydrat und 1 g Zitronensäure Monohydrat beigefügt und filtriert.

0,05 % Lithiumcarbonat-Lösung: Es wurden 0,5 g Lithiumcarbonat in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst.

Luxol Fast Blue-Lösung: 0,1 g Luxol Fast Blue MBS wurde in 100 ml 96 %igem Ethanol gelöst und 0,5 ml 100 %ige Essigsäure dazugegeben.

PBS (10x Stocklösung): Für die PBS Stocklösung wurden 4000 ml destilliertes Wasser in einen 5 l großen Messbecher gefüllt, 1 Dose PBS-Pulver ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ eingefüllt und mit einem Magnetrührer vermischt. Wenn das Pulver sich komplett aufgelöst hatte, wurde der Messbecher bis zur 5000 ml Markierung mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

PBS (1x Fertiglösung): 500 ml PBS (10x Stocklösung) wurde mit 4500 ml destilliertem Wasser vermischt. Anschließend wurde der pH-Wert mit 1 molarer Salzsäure auf 7,4 eingestellt.

Tris-EDTA Puffer: 6,05 g Tris und 1,85 g EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat wurden in 5 l destilliertem Wasser gelöst. Der pH wurde auf 9.0 eingestellt.

2.2 Daten zu den Versuchstieren

In diesem Kapitel sind die Informationen zu den Versuchstieren dargestellt. Die Informationen über die verwendeten Chemikalien und Materialien sind in Tab. 1 aufgelistet.

Für den in Kapitel 2.3 beschriebenen Versuchsaufbau wurden 45 weibliche, 8 Wochen alte, 19 - 21 g schwere Wildtyp Mäuse vom Stamm C57BL/6J verwendet. Die Haltung der Tiere in den Räumlichkeiten des Max-von-Pettenkofer-Instituts (Pettenkoferstr. 11, 80336 München, Deutschland) und das Handling durch die Pfleger erfolgte nach standardisierten Laborbedingungen gemäß der FELASA Organisation (engl. Federation of European Laboratory Animal Science Association's). Die Tiere wurden in Gruppen von maximal fünf Artgenossen in individuell ventilierten Tierkäfigen TYP II L BlueLine (435 cm²) gehalten. Die Käfige wurden täglich kontrolliert und jeden zweiten Tag gewechselt.

Die Mäuse wurden in einem Tierstall bei einer stetigen Luftfeuchtigkeit von $50 \pm 5 \text{ \% g/m}^3$ und einer Raumtemperatur von $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ gehalten. Die Käfige waren an ein Überdruck-Belüftungssystem angeschlossen und somit mit zirkulierender Raumluft (60 - 80 Luftwechsel/h) versorgt. Das Beleuchtungssystem im Tierstall wurde der zirkadianen Rhythmik (13 Stunden Tag, 11 Stunden Nacht) der Tiere angepasst. Leitungswasser und Haltungsfutter wurden ad libitum angeboten. Als Enrichment dienten Nestbaumaterial und rote Maushäuser. Bei der Arbeit mit den Versuchstieren wurden die aktuell geltenden Tierschutzbestimmungen gemäß Paragraf 8 des Tierschutzgesetzes eingehalten. Der Erweiterungsantrag zum Tierversuch 55.2-154-2532-73-15 wurde von der Regierung von Oberbayern genehmigt und ordnungsgemäß durchgeführt.

2.3 Versuchsaufbau und Durchführung

In diesem Kapitel ist der Ablauf des Tierversuchs dargestellt. Die detaillierte Durchführung der Behandlungsschritte ist in Kapitel 2.3.1, 2.3.2, 2.3.3 und 2.3.4 erläutert.

Die Versuchstiere kamen einen Monat vor Versuchsbeginn im Alter von acht Wochen in den Tierstall des Max-von-Pettenkofer-Instituts, indem sowohl Tierhaltung und Versuchsdurchführung stattfanden. Jedes Versuchstier wurde ab Einstallung bis Versuchsende einmal pro Woche gewogen und die Gewichtszunahme wurde dokumentiert. Der Versuch wurde begonnen, sobald alle Versuchstiere ein Gewicht zwischen 19 - 21 g erreicht hatten. Die 45 Versuchstiere wurden zufällig in eine Kontrollgruppe (Gruppe A) mit $n = 5$ Mäusen und vier Gruppen (Gruppe B, C, D und E) mit je $n = 10$ Mäusen eingeteilt (Abb. 5). Um die Mäuse unterscheiden zu können, wurde bei jeder Maus eines Käfigs eine individuelle Markierung in die Ohren gestanzt: entweder keine (ohne); jeweils eine rechts (rechts) oder links (links); jeweils zwei links (links/links) oder rechts und links (rechts/links).

In diesem fünf Wochen langen Tierversuch wurden 45 Mäuse in fünf Gruppen (A - E) eingeteilt und unterschiedlich behandelt (Abb. 5).

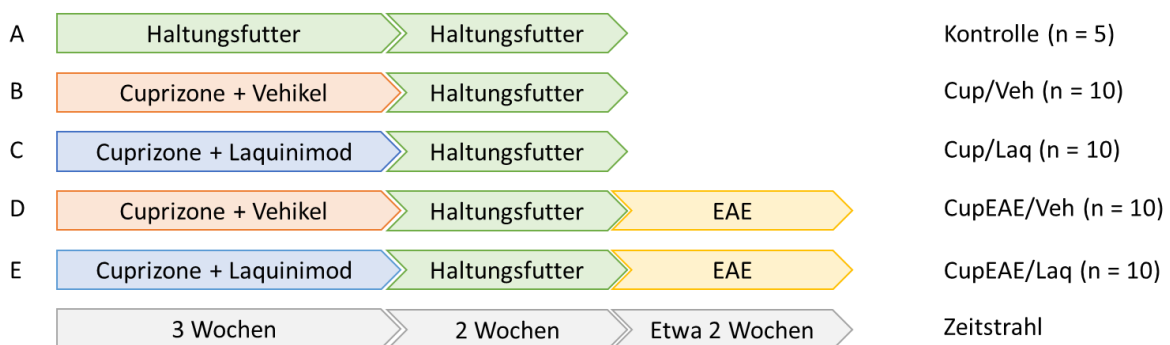


Abb. 5 Versuchsaufbau

A Kontrollgruppe ($n = 5$), die über einen fünfwöchigen Zeitraum mit Haltungsfutter versorgt wurde. **B** Cup/Veh-Gruppe ($n = 10$), die eine Cuprizone- & Vehikel-Behandlung für drei Wochen erhielt, gefolgt von einer zweiwöchigen Gabe von Haltungsfutter. **C** Cup/Laq-Gruppe ($n = 10$), die eine Cuprizone- und Laquinimod-Behandlung erhielt, gefolgt von einer zweiwöchigen Gabe von Haltungsfutter. **D** CupEAE/Veh-Gruppe ($n = 10$), die für die ersten fünf Wochen gleich behandelt wurde wie Gruppe B, gefolgt von einer EAE-Immunisierung. **E** CupEAE/Laq-Gruppe ($n = 10$), die für die ersten fünf Wochen gleich behandelt wurde wie Gruppe C, gefolgt von einer EAE-Immunisierung.

Die Gruppen A, B und C dienten dazu, den neuroprotektiven Effekt von Laquinimod zu verifizieren. Gruppe A mit fünf Versuchstieren entsprach der Kontrollgruppe. Diese Gruppe erhielt über den gesamten Versuchszeitraum täglich das Haltungsfutter.

Die Gruppe B und C wurden über drei Wochen mit Cuprizone intoxikiert (Kapitel 2.3.1). Während der Cuprizone-Intoxikation folgte eine dreiwöchige Vehikel-Gabe per Schlundsonde

(Cup/Veh-Gruppe) für Gruppe B, und eine dreiwöchige Laquinimod-Gabe (200 µl; 25 mg/kg) per Schlundsonde (Cup/Laq-Gruppe) für Gruppe C (Kapitel 2.3.2). Nach der dreiwöchigen Behandlung folgte bei beiden Gruppen eine zweiwöchige Gabe von Haltungsfutter, um die Demyelinisierung fortschreiten zu lassen, die Inhibition des Cuprizones auf die T-Zell Antwort zu vermeiden und das Laquinimod auszuwaschen. Nach der fünften Behandlungswoche wurden die Tiere transkardial perfundiert und die Hirne präpariert (Kapitel 2.3.4).

Mit der Gruppe D und E wurde untersucht, ob der neuroprotektive Effekt von Laquinimod auf den Untergang von Oligodendrozyten und die Aktivierung von Mikrogliazellen sekundär zur Reduktion von perivaskulärer Inflammation, Immunzellrekrutierung und Fortschreiten der Hirnläsionen im CupEAE-Modell führt.

Gruppe D wurde in den ersten drei Wochen gleich behandelt wie Gruppe B. Ebenso erhielt Gruppe E in den ersten drei Wochen die gleiche Behandlung wie Gruppe C. Nach einer zweiwöchigen Gabe von Haltungsfutter wurde Gruppe D und E mit MOG₃₅₋₅₅ immunisiert (D: CupEAE/Veh-Gruppe, E: CupEAE/Laq-Gruppe). Die klinischen Scores der Tiere wurden täglich gemessen (Kapitel 2.3.3). Sobald die Tiere einen maximalen Score erreicht hatten, wurden sie transkardial perfundiert und die Hirne präpariert (Kapitel 2.3.4).

2.3.1 Die Cuprizone-Fütterung

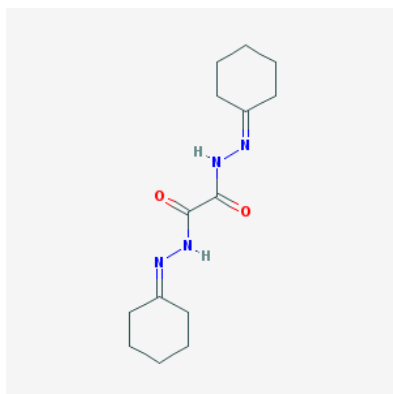


Abb. 6 Chemische Formel von Cuprizone (Pubchem, 2005).

Gruppe B, C, D und E wurden jeweils für drei Wochen mit Cuprizone-Futter intoxiciert. N,N'-Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazon (Cuprizone C₁₄H₂₂N₄O₂) ist ein Kupferchelator, der zu einer toxischen Demyelinisierung, Astrozytose und Mikrogliose führt (Abb. 6) (Norkute et al., 2009).

Für die Cuprizone-Fütterung wurde 100 g gemahlenes Futter pro Käfig in einen Mixer gegeben und mit 0,25 % Cuprizone für eine Minute auf höchster Stufe vermischt. Um eine homogene Mischung zu erhalten, wurde der Mixer während der Minute zu allen Seiten geschwenkt. Diese Methode wurde von unserer Arbeitsgruppe als Goldstandard für eine reproduzierbare Demyelinisierung und Mikrogliazellaktivierung im CC von Versuchstieren festgelegt (Hochstrasser et al., 2017).

Die Mischung aus Cuprizone und gemahlenem Futter wurde jedem Käfig in zwei separaten Petrischalen dargeboten. Diese Mischung wurde täglich frisch angesetzt und in jedem Käfig ausgetauscht, wodurch saubere Futterbedingungen sichergestellt wurden. Durch die Umstellung von Haltungsfutter auf gemahlenes Futter in der Petrischale, verloren die Versuchstiere in der ersten Woche an Gewicht.

2.3.2 Die Medikamentengabe über eine Schlundsonde

Zusätzlich zur täglichen Cuprizone-Fütterung erhielten die Versuchstiere der Gruppe B, C, D und E eine tägliche Flüssigkeitsgabe von 200 µl über eine Schlundsonde. Gruppe B und D wurden täglich mit 200 µl doppelt destilliertem Wasser als Trägerlösung behandelt. Im Vergleich dazu erhielten Gruppe C und E täglich 200 µl gelöstes Laquinimod. Die Dosierung des Laquinimods wurde aus einer Studie von Wegner et al. übernommen (Wegner et al., 2010).

Die Flüssigkeitsgabe per Schlundsonde startete zwei Tage vor der Cuprizone-Fütterung und wurde drei Wochen und zwei Tage täglich durchgeführt. Für die Verabreichung mit der Schlundsonde wurden 1 ml Heparinspritzen und zwei verschiedene Metallsonden verwendet. Eine Metallsonde wurde nur für die Vehikel-Gruppe und die andere Metallsonde nur für die Laquinimod-Gruppe verwendet. Als Vehikel-Lösung wurde doppelt destilliertes Wasser verwendet. Für die Laquinimod-Gabe wurden 0,5 mg Laquinimod in 200 µl doppelt destilliertem Wasser gelöst. Vor der Behandlung wurde jede Heparinspritze einfach mit destilliertem Wasser und doppelt mit Luft gespült. Für die Injektion wurde jede Maus am Nacken und am Schwanz gefasst und in der rechten Hand auf dem Rücken fixiert. Die Vehikel- oder Laquinimod-Lösung wurde in die Heparinspritze aufgezogen und alle Luftblasen entfernt bis eine homogene Lösung von 200 µl in der Spritze war. Die Injektion mit der Schlundsonde erfolgte mit der linken Hand in den Mund-Rachen-Raum des Versuchstiers. Um die Sondierung so schonend wie möglich durchzuführen, wurde ein Tropfen Flüssigkeit auf den Kopf der Metallsonde vorgelegt und an den Mund der Maus herangeführt. Der ausgelöste Schluckreflex durch den Tropfen Flüssigkeit wurde ausgenutzt, um die Sonde vorsichtig vorzuschieben und die Lösung zu applizieren. Um sicherzustellen, dass kein Versuchstier verletzt wurde, wurde jedes Versuchstier nach der Injektion etwa 30 Sekunden im Käfig beobachtet und das explorative Verhalten beurteilt.

2.3.3 Die EAE-Immunisierung

Im ersten Absatz dieses Kapitels ist die Wirkungsweise der EAE-Immunisierung erklärt. Die genaue Durchführung der Immunisierung und das Scoring der klinischen Symptome ist im weiteren Verlauf des Kapitels beschrieben.

Die EAE ist ein T-Zell vermitteltes MS-Tiermodell, das zur Einwanderung peripherer Immunzellen in das ZNS führt. Gruppe D und E wurden immunisiert, um zu untersuchen, ob eine Laquinimod-Behandlung die sekundäre Immunzellrekrutierung ins Telencephalon reduziert. Gruppe D und E wurden in der sechsten Woche des Behandlungsplans immunisiert. Bei diesem Versuch wurde den Versuchstieren das Blasentriplett 35-55 des Myelin-Oligodendrozyten-Glykoproteins (MOG₃₅₋₅₅-Peptid) injiziert. Nach dem Kontakt mit dem MOG₃₅₋₅₅-Fragment bildeten sich enzephalitogene T-Zellen aus peripheren lymphatischen Organen, die sich gegen körpereigenes MOG im ZNS richten.

Für die Narkose des Versuchstiers wurde ein Wattepad mit Isofluran (2,5 Vol%) getränkt und in ein röhrenförmiges Glasgefäß gelegt. Zur Inhalationsnarkose wurde jede Maus für 30 - 90 Sekunden in den mit Isofluran gefluteten Glaskolben gesetzt. Sobald die Maus einen verlangsamten Herzschlag und eine schlaffe Parese zeigte, konnte von einer ausreichend tiefen Narkose ausgegangen werden. Ein Versuchstier der CupEAE/Veh-Gruppe verstarb bei der Narkose für die EAE-Immunisierung, wurde transkardial perfundiert und als TN484 in die Cup/Veh-Gruppe (B) integriert.

Zur Herstellung der Wasser-in-Öl-Emulsion des MOG₃₅₋₅₅-Peptids wurde ein ready-to-use kit verwendet. Dabei wurde inkomplettes Freund'sches Adjuvans mit inaktivierten Mykobakterium tuberculosis in einer Konzentration von 4 mg/ml versetzt. 1 ml des kompletten Freund'schen Adjuvans wurde mit 1 ml des MOG₃₅₋₅₅-Peptids, das in PBS gelöst ist, in einer Heparinspritze vermischt.

Jeder Maus wurde jeweils 100 µl der MOG₃₅₋₅₅-Emulsion subkutan in den Nacken und in die Glutealregion verabreicht. Nach der Injektion bildete sich an der Einstichstelle eine Beule. Am gleichen Tag und 24 h später wurde jedem Versuchstier 150 µl Pertussis Toxin in PBS gelöst intraperitoneal gespritzt, welches die Emigration von autoreaktiven T-Zellen aus der Milz in den Organismus fördert.

2.3.4 Das EAE-Scoring

Die immunisierten Tiere wurden täglich nach einem bestimmten EAE-Scoring Protokoll klinisch untersucht. Das Protokoll definiert für verschieden starke klinische Ausfallerscheinungen des Versuchstiers einen Wert und umfasst Scores von 0 - 5 (Barthelmes et al., 2016). Je schwerwiegender die klinische Ausfallerscheinung ist, desto höher ist der Score. Folgende klinische Scores wurden für entsprechende Symptome vergeben:

- Score 0 keine Krankheitssymptome
- Score 1 Lähmung des Mausschwanzes oder Parese der Hinterbeine
- Score 2 Lähmung des Mausschwanzes und Parese der Hinterbeine
- Score 3 Plegie der Hinterbeine
- Score 4 Plegie der Hinterbeine, Parese der Vorderbeine
- Score 5 Tod durch EAE

Tab. 4 zeigt die Werte des EAE-Scorings der CupEAE/Veh- und CupEAE/Laq-Gruppe. Für die klinische Untersuchung wurde jedes Versuchstier beim Laufen einmal auf einem Gitter und einmal auf der glatten Werkbank beobachtet. Die ersten neun Tage wurde jedes Versuchstier mit 0 gescort. Die ersten klinischen Symptome zeigte ein Versuchstier der CupEAE/Veh-Gruppe am zehnten Tag. Zehn Tiere entwickelten bis zum 15. Tag einen ausreichenden Score und wurden euthanasiert (grün markiert). Bis zum 18. Tag entwickelten vier weitere Versuchstiere aus der CupEAE/Veh- und CupEAE/Laq-Gruppe einen ausreichenden Score und wurden euthanasiert (türkis markiert). Fünf Tiere zeigten keine klinischen Ausfallerscheinungen während des gesamten Versuchs (grau markiert) (Tab. 4).

Tab. 4 EAE-Scoring

Scoring-Werte der CupEAE/Veh- und CupEAE/Laq-Gruppe. Das EAE-Scoring vergibt Werte zwischen 0 - 5. Je höher der Score, desto schwerwiegender das klinische Symptom. Bis zum 9. Tag zeigte kein Versuchstier ein klinisches Symptom (Score = 0). Zehn Versuchstiere wurden am 15. Tag (grün markiert) und vier weitere Versuchstiere am 18. Tag (türkis markiert) euthanasiert und in den Versuch mitaufgenommen. Vier Versuchstiere entwickelten keine klinischen Ausfallerscheinungen (grau markiert).

Gruppe	Ohrmarkierung	d7	d8	d9	d10	d11	d12	d13	d14	d15	d16	d17	d18
CupEAE/ Veh	Ohne	0	0	0	0	0	0	0,5	1,5	2			
	Links	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Rechts	0	0	0	2	2	2,5	3,5	3,5	4			
	Links/links	0	0	0	0	0	1	1	2	2			
CupEAE/ Veh	Ohne	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0,5	1	1
	Links	0	0	0	0	0	0,5	1	0	0	0	1,5	1,5
	Rechts	0	0	0	0	0	1	1	1,5	3,5			
	Links/links	0	0	0	0	0	0	0	1	1,5			
	Links/rechts	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	1,5	1,5	1,5
CupEAE/ Laq	Ohne	0	0	0	0	1	2,5	3,5	3,5	3,5			
	Links	0	0	0	0	0	0	0,5	1	2			
	Rechts	0	0	0	0	0	0	0,5	1	1			
	Links/links	0	0	0	0	0	0	0,5	0,5	0,5			
	Links/rechts	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CupEAE/ Laq	Ohne	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Links	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	1,5	1,5
	Rechts	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Links/links	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Links/rechts	0	0	0	0	1	1,5	2	2,5	2,5			

2.3.5 Die Perfusion der Versuchstiere

Am Ende des jeweiligen Behandlungszeitraums von Gruppe A - E wurden die Versuchstiere mit einfach konzentrierter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS (1x)) transkardial perfundiert und mittels 3,7 %iger Formaldehyd-Lösung fixiert.

Die Versuchstiere wurden mit 10 %iger Ketamin – Xylazin – Lösung euthanasiert. Für zehn Mäuse wurde 9,5 ml Lösung bestehend aus 100 µl Xylazin 2 %, 400 µl Ketamin 10 % und 9 ml NaCl, hergestellt. Das benötigte PBS wurde in ein Becherglas umgefüllt und auf Eis gestellt.

Für die Perfusionslösung wurde 4,6 g Natriumdihydrogenphosphat (wässrig), 8,0 g Dinatriumhydrogenphosphat, 100 ml 37 %iges Formaldehyd und 900 ml destilliertes Wasser in ein ausreichend großes Gefäß gegeben. Das Gemisch wurde mit Hilfe eines Magnetrührers bis zum Auflösen der Salze vermischt. Der pH-Wert der Lösung wurde durch Zugabe von 1

mol/L Natronlauge auf 7,4 titriert. Nach der Filtration wurde die 3,7 %ige Formaldehyd-Lösung auf Eis gestellt.

Um Verwechslungen vorzubeugen, wurde im durchführenden Labor für jedes perfundierte Versuchstier eine fortlaufende Tiernummer (TN Nummer) vergeben. Die Kontrollgruppe erhielt die Nummern TN456 - 460. Gruppe B erhielt die Nummern TN461 - 465, TN471 - 475 und TN484. Gruppe C wurde mit TN466 - 470 und TN476 - 480 bezeichnet. Gruppe D erhielt die Nummern TN485 - 489 und TN498 - 501. Gruppe E erhielt die Nummern TN490 - 494 und TN507 - 511.

Für die Perfusion wurde jedes Versuchstier im Nacken gefasst und in der rechten Hand fixiert. Zur Euthanasie wurde jedem Tier 0,7 - 0,9 ml 10 %ige Ketamin-Lösung intraperitoneal injiziert. Die Maus wurde zurück in den Käfig gesetzt und bis zum Bewusstseinsverlust beobachtet. Als Schutz- und Schmerzreflexe der Maus erloschen waren, wurde sie an allen vier Extremitäten mit Stecknadeln auf einer Bienenwachsplatte fixiert. Die Bauchhaut und das Peritoneum wurden mit chirurgischem Besteck eröffnet. Beim Übergang zum Thorax wurden das Zwerchfell und die Rippen durchtrennt und das Herz frei präpariert. Das rechte Atrium wurde mit einer chirurgischen Schere eröffnet, um die durchlaufenden Lösungen austreten zu lassen. In den linken Ventrikel wurde vom Apex in Richtung des linken Herzhohls eine gekürzte Safety-Multifly-Kanüle gelegt und mit Stecknadeln auf dem Bienenwachs gesichert.

Um das Blut aus dem Organismus der Maus zu entfernen, wurde jedes Versuchstier mit 20 ml gekühltem PBS transkardial durchspült. Zur Fixation wurden zwei 50 ml Spritzen mit 3,7 %iger Formaldehyd-Lösung unter einer Abzugshaube in das Herz der Maus injiziert und mit Hilfe des Drucks im gesamten Organismus verteilt. Durch die Formaldehyd-Lösung kam es zur Denaturierung der Körperproteine, was durch Krämpfe in der Muskulatur sichtbar wurde. Die natriumreiche Lösung führte zu Zuckungen in der Muskulatur des Versuchstiers und zeigte die perfundierten Körperregionen an. Nach der vollständigen Injektion des Formaldehyds wurde der Kopf des Versuchstiers abgetrennt und mit Hilfe von Pinzetten fixiert. Die Kopfhaut und die Schädelkalotte wurde in sagittaler Schnittführung eröffnet. Die Schädelkalotte wurde aufgefächert und der Kopf der Maus über Nacht in 3,7 %iger Formaldehyd-Lösung in einem 50 ml Tube bei 4 °C gelagert.

2.4 Materialgewinnung Region 215, Region 265 und Rückenmark

Nach der Postfixation bei 4 °C wurde der Kopf der Maus mit einer Pinzette fixiert, die Schädelkalotte entfernt und das Hirn freipräpariert. Mit Hilfe eines Metallspatels wurde das Hirn aus dem Viscerocranium herausgehoben und eine 0,3 cm dicke Scheibe des Frontalhirns mit einer Rasierklinge abgetrennt. Die präparierten Mäusegehirne wurden mit der ventralen Oberfläche nach unten zeigend einzeln in Einbettkassetten gegeben und entsprechend beschriftet. Für die Gewinnung des Rückenmarks wurden die Wirbelkörper vorsichtig mit Pinzetten abgetrennt und somit der gesamte Rückenmarksstrang freipräpariert. Das Rückenmark wurde mit einem Skalpell in vier gleich große Teile geschnitten und in Einbettkassetten von Rostral nach Kaudal einsortiert und entsprechend beschriftet. Die Einbettkassetten wurden zuerst für fünf Stunden unter fließendem Leitungswasser und daraufhin in einem ausreichend großen Gefäß in Alkohol-Lösungen mit steigenden Konzentrationen auf einem Horizontalschüttler gespült. Die aufsteigende Alkoholreihe entzog den Präparaten Wasser, um das Gewebe gut zu fixieren. Daraufhin wurden die Präparate für jeweils 40 min in Xylol 1, 2 und 3 gegeben und auf einem Horizontalschüttler bewegt. Zur endgültigen Einbettung wurden die Präparate in Paraffin 1, 2 und 3 gelagert (Tab. 5).

Tab. 5 Paraffineinbettung

Schritt	Chemikalie	Dauer
1	Leitungswasser, fließend	5 h
2	50 % Ethanol	Über Nacht
3	70 % Ethanol – 1	40 min
4	70 % Ethanol – 2	40 min
5	96 % Ethanol – 1	40 min
6	96 % Ethanol – 2	40 min
7	96 % Ethanol – 3	40 min
8	100 % Ethanol – 1	40 min
9	100 % Ethanol – 2	60 min
10	100 % Ethanol – 3	60 min
11	Xylol – 1	40 min
12	Xylol – 2	40 min
13	Xylol – 3	40 min
14	Paraffin – 1	60 min
15	Paraffin – 2	60 min
16	Paraffin – 3	2 Tage

Für das Schneiden der Paraffinblöcke wurde ein Schlittenmikrotom verwendet. Zur Vorbereitung wurde als Erstes das Wasserbad mit destilliertem Wasser auf 48 °C erhitzt. Der Paraffinblock wurde in das Mikrotom eingespannt und mit Hilfe der Seiteneinstellungen parallel zum Schlittenmesser eingestellt. Es wurde eine Schnittdicke von 5 µm eingestellt und so viele Schnitte abgenommen bis der Block parallel zum Schlittenmesser stand und gleichmäßige Schnitte entstanden. Zum Abheben des Schnittes wurde ein nasses Seidenpapier verwendet, womit der Schnitt ins Wasserbad gelegt wurde. Mit Hilfe einer Nadel wurden jeweils zwei Schnitte auf einen Objektträger gezogen. Sobald Hirnregionen im Paraffinblock angeschnitten wurden, wurden die Schnitte mikroskopiert. Bei Erreichen der gewünschten Region wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen. Die Paraffinblöcke der Gruppe A, B und C wurden bis Region 215 auf Höhe der vorderen Kommissur des High Resolution Mouse Brain Atlas von Sidman et al. (Abb. 7) angeschnitten und jeweils fünf Objektträger von dieser Region pro Tier aufgezogen. Von der Gruppe D und E wurden jeweils zehn Objektträger von Region 215 aufgezogen.

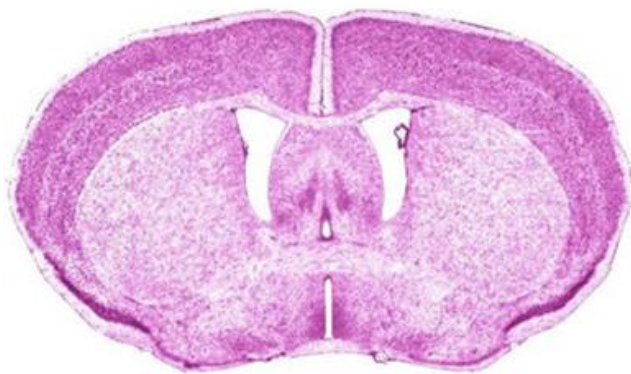


Abb. 7 Sidman Mouse Brain Atlas, R215 (Sidman, 1971).

Im Versuch wurden auch die hinteren Hirnregionen im Bereich des rostralen Hippocampus untersucht. Dafür wurden die Paraffinblöcke der Gruppe A - E bis zur Region 265 angeschnitten und jeweils zehn Objektträger pro Versuchstier aufgezogen (Abb. 8).

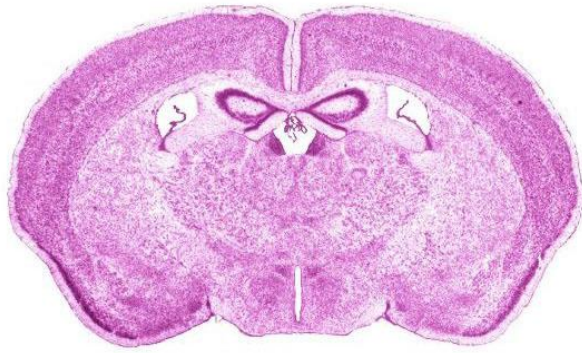


Abb. 8 Sidman Mouse Brain Atlas, Region 265 (Sidman, 1971).

2.5 Immunhistochemische Färbungen

Zur Darstellung von unterschiedlichen Antigenen im ZNS wurde in dieser Arbeit die chromogene Immunhistochemische Färbung nach der ABC - Methode angewendet. Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine zweistufige, indirekte immunhistochemische Färbung nach dem folgenden Prinzip (Abb. 9):

- Der Primärantikörper (monoklonal oder polyklonal) bindet an das gesuchte Antigen (Abb. 9 **A**).
- An den Primärantikörper bindet ein Sekundärantikörper, der Biotin gebunden hat (Abb. 9 **B**).
- Durch die Affinität von Avidin zu Biotin bildet sich ein Avidin-Biotin-Komplex (ABC). Im ABC-Komplex ist eine biotinylierte Peroxidase gebunden (Abb. 9 **C**).
- Die gebundene Peroxidase katalysiert nach Zugabe des DAB-Komplexes (3,3-Diaminobenzidin (DAB)+ Chromogen und 3,3-Diaminobenzidin (DAB)+ Substrat) eine Reaktion mit Wasserstoffperoxid. Es kommt zur Ausfällung eines bräunlichen Niederschlags. Mit diesem kann das Antigen indirekt nachwiesen werden (Abb. 9 **D**).

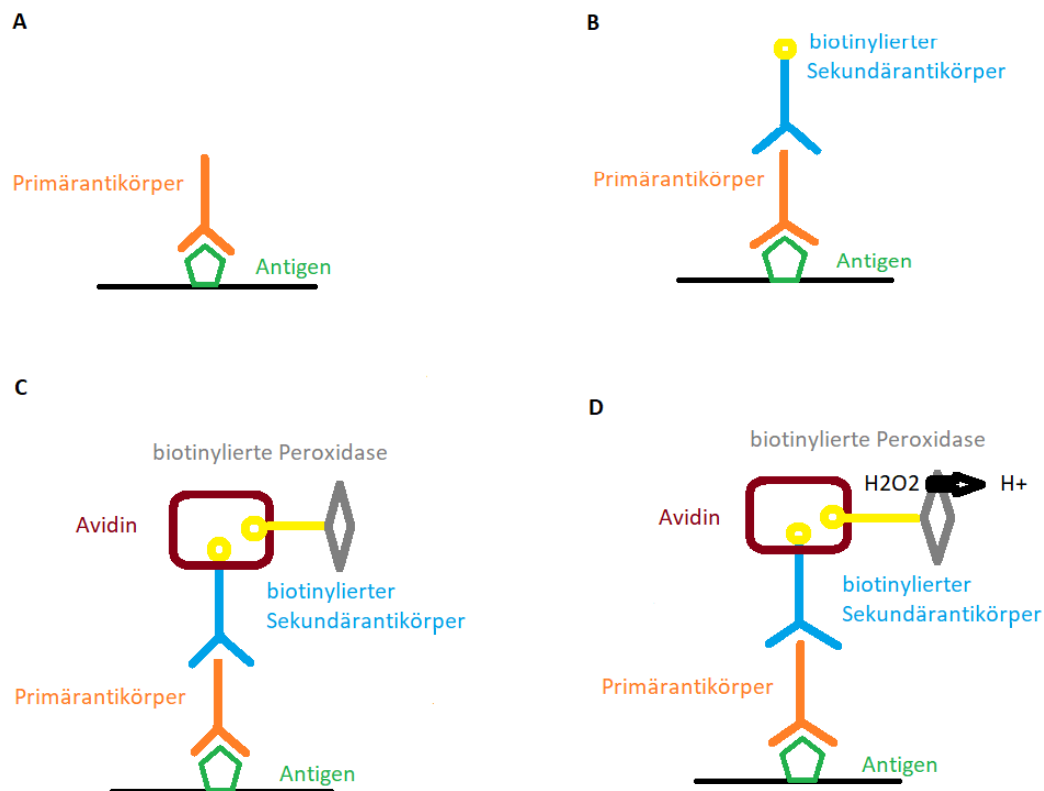


Abb. 9 Schematische Darstellung der ABC Methode.

Jede der vier Färbungen folgte dem Färbeprotokoll, dass in den Unterpunkten a) – s) beschrieben ist. Durch diese standardisierte Durchführung sind vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse der Färbungen zu erwarten. In den nachfolgenden Unterpunkten a) - s) ist die genaue Durchführung der chromogenen Färbung beschrieben:

- Zur Entparaffinierung der Schnitte wurden die Objektträger in Färbeschaukeln durch die absteigende Alkoholreihe geführt (Tab. 6).
- Um die Antigene zu demaskieren, wurden bestimmte Schnitte in Tris/EDTA pH 9 gekocht (Demaskierung durch HIER-Methode engl. heat induced epitope retrieval). Dafür wurden die Objektträger in eine neue Färbeschaukel gegeben und die leeren Stellen mit Platzhaltern aufgefüllt. Die gefüllte Färbeschaukel wurde in das Gefäß mit Tris/EDTA Lösung gegeben und für zwei Minuten auf höchster Stufe in der Mikrowelle gekocht. Nach zwei Minuten wurden die Schnitte für zehn Minuten auf schwacher Hitze in der Mikrowelle gehalten. Zur Abkühlung der Schnitte wurde das Gefäß mit der Objektträgerschaukel für fünfzehn Minuten mit kaltem Wasser im Waschbecken umspült.
- Dreimal fünfminütiges Spülen in PBS auf dem Horizontalschüttler.

- d) Für die folgenden Schritte d) - m) wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer behandelt, um die Schnitte nicht auszutrocknen. Um einer unspezifischen Hintergrundfärbung vorzubeugen, folgte der Blocking-Schritt. Dafür wurde auf jeden Objektträger à zwei Hirnschnitten 100 µl 5 % normales Ziegenserum gegeben und für eine Stunde bei 26 °C inkubiert.

Tab. 6 Absteigende Alkoholreihe

Schritt	Chemikalie	Dauer
1	Xylol I	10 min
2	Xylol II	10 min
3	Xylol III	10 min
4	Xylol/Ethanol 50 %/50 %	5 min
5	Ethanol 100 %	3 min
6	Ethanol 100 %	3 min
7	Ethanol 96 %	3 min
8	Ethanol 96 %	3 min
9	Ethanol 70 %	3 min
10	Ethanol 50 %	3 min
11	Destilliertes Wasser	3 min

- e) Nach der Inkubation des Blocking Serums, wurde der gesuchte Primärantikörper in einer bestimmten Verdünnung mit 5 % Normalem Ziegenserum gemischt und gevortext. Die Verdünnung für den jeweiligen Antikörper ist in Tab. 7 dargestellt. Es wurde je 100 µl des Primärantikörpers mit einer 100 µl Pipette auf die Hirnschnitte auf den Objektträger gegeben. Die Objektträger wurden in der feuchten Kammer über Nacht für etwa 14 Stunden mit dem Primärantikörper bei 4 °C inkubiert.

Tab. 7 Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Demaskierung	Hersteller	Bestellnummer
Anti-CD4	Hase	1:1000	Tris/EDTA	Abcam, Cambridge, UK	ab183685
Anti-IBA1	Hase	1:5000	Tris/EDTA	Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland	019-19741
Anti-MAC-3	Ratte	1:200	Tris/EDTA	BD Pharmingen	550292
Anti-PLP	Maus	1:5000	keine	Serotec	MCA839G

- f) Dreimal fünfminütiges Spülen in PBS auf dem Horizontalschüttler.
- g) Für den Peroxidase-Block wurde 1 ml 30 %iger Wasserstoffperoxid in 99 ml PBS in einer Glasküvette vermischt. Die Objektträger wurden 30 Minuten in der 3 %igen H₂O₂-Lösung mit Schutz vor Sonnenlicht inkubiert.
- h) Dreimal fünfminütiges Spülen in PBS auf dem Horizontalschüttler.

- i) Der Sekundärantikörper wurde 1:200 mit 5 %igem normalem Ziegenserum verdünnt, gevortext und pro Objektträger 100 µl auf die Hirnschnitte appliziert (Tab. 8). Die Objektträger wurden in der feuchten Kammer für eine Stunde bei 26 °C inkubiert.

Tab. 8 Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Firma	Bestellnummer
Anti-Hase IgG (biotinyliert)	Ziege	1:200	Linaris GmbH, Mannheim, Deutschland	BA1000
Anti-Maus IgG (biotinyliert)	Ziege	1:200	Linaris GmbH	BA9200
Anti-Ratte IgG (biotinyliert)	Ziege	1:200	Linaris GmbH	BA9400

- j) Dreimal fünfminütiges Spülen in PBS auf dem Horizontalschüttler.
- k) Applikation des Avidin-Biotin-Komplexes, der 30 Minuten zuvor vorbereitet wurde und dunkel gelagert wurde. Lösung A und Lösung B des Vectastain Elite Kit wurden 1:50 mit PBS vermischt und jeweils 100 µl auf jeden Objektträger pipettiert. Die Schnitte wurden in einer feuchten Kammer für eine Stunde bei 26 °C inkubiert.
- l) Dreimal fünfminütiges Spülen in PBS auf dem Horizontalschüttler.
- m) Applikation des DAB-Komplexes zur Visualisierung. Der DAB-Stock wurde 1:50 mit dem DAB-Substrat verdünnt und auf die Objektträger gegeben. Die Schnitte wurden zehn Minuten unter dem Abzug bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin für 5 Sekunden in Leitungswasser gespült.
- n) Fünfminütiges Spülen in destilliertem Wasser.
- o) Für die Kernfärbung wurden die Schnitte für fünfzehn Sekunden in der Hämatoxylin-Lösung inkubiert und zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut.
- p) Dreiminütiges Spülen in destilliertem Wasser.
- q) Zur Dehydrierung der Gewebeschnitte wurde die aufsteigende Alkoholreihe verwendet (Tab. 9).

Tab. 9 Aufsteigende Alkoholreihe

Schritt	Chemikalie	Dauer
1	Ethanol 50 %	3 min
2	Ethanol 70 %	3 min
3	Ethanol 96 %	3 min
4	Ethanol 96 %	3 min
5	Ethanol 100 %	3 min
6	Ethanol 100 %	3 min
7	Xylol/Ethanol 50 %/50 %	5 min
8	Xylol I	10 min

9	Xylol II	10 min
10	Xylol III	10 min

- r) Eindecken der Schnitte mit DPX.
- s) Die Objektträger wurden mit Gewichten beschwert und über Nacht unter dem Abzug getrocknet.

2.5.1 Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Färbung

Mit Hilfe der Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Färbung kann die Morphologie und die Struktur des Gewebes untersucht und differenziert werden, ob es sich um normales, entzündliches, pathologisches oder degenerativ verändertes Gewebe handelt.

Die H.E. Färbung ist eine dichromatische Färbung und setzt sich aus einem Farbstoff für die Zellkerne (Hämatoxylin) und einem Farbstoff für das Zytoplasma (Eosin) zusammen. Hämatoxylin ist ein basischer Farbstoff, der eine hohe Affinität zu der negativ geladenen, basophilen Nucleinsäure im Kerninneren hat. Dadurch färben sich die Kerne in H.E. Färbungen blau/violett. Eosin ist ein saurer Farbstoff, der an positiv geladene, eosinophile Bestandteile im Zytoplasma bindet und diese rosa färbt. Die genaue Durchführung der H.E. Färbung ist im Färbeprotokoll Tab. 10 beschrieben. Die Durchführung wurde in Entparaffinierung, H.E. Färbung und Dehydrierung der Gewebeschnitte eingeteilt. Während des gesamten Färbvorgangs wurden die Objektträger in einer Färbeschaukel gelagert, die zur Inkubation in die verschiedenen Chemikalien gesetzt wurde.

Tab. 10 H.E. Färbeprotokoll

Schritt	Chemikalie	Dauer
1	Xylol I	10 min
2	Xylol II	10 min
3	Xylol/Ethanol 50 %/50 %	5 min
4	Ethanol 100 %	3 min
5	Ethanol 100 %	3 min
6	Ethanol 96 %	3 min
7	Ethanol 96 %	3 min
8	Ethanol 70 %	3 min
9	Ethanol 50 %	3 min
10	Destilliertes Wasser	3 min
11	Mayer Hämatoxylin	7 min
12	Destilliertes Wasser	10 sek
13	Fließendes Leitungswasser	10 min
14	Eosin	3 min

15	Destilliertes Wasser	10 sek
16	Ethanol 50 %	3 min
17	Ethanol 70 %	3 min
18	Ethanol 96 %	3 min
19	Ethanol 96 %	3 min
20	Ethanol 100 %	3 min
21	Ethanol 100 %	3 min
22	Xylol/Ethanol 50 %/50 %	5 min
23	Xylol I	10 min
24	Xylol II	10 min

Als letzter Schritt wurden die Objektträger mit DPX eingedeckt, mit Gewichten belegt und unter dem Abzug über Nacht getrocknet.

2.5.2 Luxol Fast Blue/PAS (LFB/PAS) Färbung

Um im ZNS eine Aussage über die Myelinisierung treffen zu können, wurde die Markscheiden-Übersichtsfärbung Luxol Fast Blue/Periodsäure-Schiff Reaktion (LFB/PAS) verwendet. Der Farbstoff LFB hat eine spezifische Affinität zu Neurokeratin und bindet über Cholinbausteine an den Phospholipiden der Markscheiden. Markhaltige Regionen werden tiefblau angefärbt und Zellkörper violett. Die Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) ist ein histochemischer Test für Kohlenhydrate, wie Mukopolysaccharide, Glykogen und Cellulose, welche in Bindegewebe vorkommen. Die Färbung setzt sich aus einem Färbeschritt und mehreren anschließenden Differenzierungsschritten zusammen. Die Färbung begann mit der Entparaffinierung der Gewebeschnitte, die nach der zweiten 96 %igen Ethanol-Lösung unterbrochen wurde und das Gewebe in die LFB-Färbelösung gestellt wurde (Tab. 11).

Tab. 11 Entparaffinierung Luxol Fast Blue/PAS Färbung

Schritt	Chemikalie	Dauer
1	Xylol II	10 min
2	Xylol I	10 min
3	Xylol/Ethanol 50 %/50 %	10 min
4	100 % Ethanol	5 min
5	100 % Ethanol	5 min
6	96 % Ethanol	5 min
7	96 % Ethanol	5 min

Das Gefäß wurde mit Parafilm und Aluminiumfolie verschlossen und zur Inkubation über Nacht im Wärmeschrank bei 61 °C gelagert. Am folgenden Tag wurden die Schnitte in 96

%igem Alkohol gespült, um die überschüssige Farbe zu lösen. Es folgte eine Spülung von 30 Sekunden in destilliertem Wasser. Zur Differenzierung wurden die Schnitte für zehn Sekunden in 0,05 %iger Lithiumcarbonat-Lösung gespült. Um die Schnitte weiter zu differenzieren, wurden sie für mindestens zwei Minuten in 70 %igen Alkohol gegeben. Die Einwirkzeit variierte für diesen Schritt und musste individuell bestimmt werden. Die Schnitte wurden entfernt, sobald die Farbintensität des Gewebes etwas reduziert, aber der Schnitt noch nicht zu bleich war. Zur Unterbrechung der Differenzierung wurden die Schnitte für 30 Sekunden in destilliertem Wasser gespült. Im nächsten Schritt wurden die Gewebeschnitte mikroskopiert, um zu kontrollieren, ob die graue Substanz farblos und die weiße Substanz in blau/türkiser Farbe erscheint. Falls die Farbintensität der Schnitte noch zu kräftig war, wurden sie in 0,01 %iger Lithiumcarbonat-Lösung für zehn Sekunden differenziert, worauf eine fünfminütige Inkubation in 70 %igem Alkohol und eine Inkubation von 30 Sekunden in destilliertem Wasser folgte. In diesem Versuch wurde ein Differenzierungsschritt in 0,05 %iger und zwei Differenzierungsschritte in 0,01 %iger Lithiumcarbonat-Lösung durchgeführt. Bis zum Beginn der PAS-Reaktion lagerten die Schnitte in destilliertem Wasser.

Für die PAS-Reaktion wurden die Gewebeschnitte für zwei Minuten in 0,5 %iger Perjodsäurelösung oxidiert und daraufhin für 30 Sekunden in destilliertem Wasser gespült. Die Objektträger wurden für 6 - 10 Minuten im Schiffschens-Reagenz inkubiert, wodurch die Gewebeschnitte leicht rosa gefärbt wurden. Es folgte ein fünfminütiger Spülvorgang im Leitungswasser, der die Schnitte dunkel pink färben ließ. Nach einem 30 sekündigen Spülen im destilliertem Wasser wurden die Kerne der Gewebeschnitte mit Mayer's Hämaalaun gefärbt. Dafür inkubierten die Schnitte 20 Sekunden in Hämaalaun und bläuten für fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser. Nach kurzem Spülen in destilliertem Wasser wurde den Schnitten das Wasser mit Hilfe der aufsteigenden Alkoholreihe beginnend mit 80 % Ethanol entzogen (Tab. 12).

Tab. 12 Aufsteigende Alkoholreihe der LFB/PAS Färbung

Schritt	Chemikalie	Dauer
1	80 % Ethanol	30 sek
2	96 % Ethanol	1 min
3	100 % Ethanol	3 min
4	100 % Ethanol	3 min
5	Xylol I	3 min
6	Xylol II	5 min
7	Xylol III	5 min

Die Objektträger wurden mit DPX eingedeckt, mit Gewichten belegt und über Nacht getrocknet.

2.6 Auswertung

Um die in Kapitel 1.4 genannten Arbeitshypothesen zu verifizieren, wurden die Gewebeschnitte der Gruppen histologisch aufgearbeitet, die immunhistochemischen Färbungen ausgewertet und statistisch verglichen.

2.6.1 Untersuchte Hirnregionen

Im Cuprizone-Modell kommt es zu Demyelinisierung, sowie zur Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten. Die Demyelinisierung findet hauptsächlich im mCC und lateralen Corpus callosum (ICC) statt. In dieser Arbeit wurde die Demyelinisierung mit Hilfe der LFB/PAS und anti-PLP Färbung untersucht. Die Aktivierung und Proliferation von Mikrogliazellen, die zum größten Teil im ICC stattfindet, wurde mit der anti-IBA1 und anti-MAC-3 Färbung untersucht.

Im Cup/EAE-Modell kommt es zur Entstehung von inflammatorisch-demyelinisierenden Herden in Form von perivaskulären Infiltraten (PVC) und damit verbunden zur Einwanderung peripherer Immunzellen ins ZNS. Um die Anzahl, Lage und Zelltypen der PVCs zu bestimmen, wurde die histologische Übersichtsfärbung H.E. genutzt. Mit Hilfe der anti-CD4 Färbung wurde untersucht, ob und wie viele CD4⁺-Immunzellen in das CC und in den Kortex eingewandert sind.

Um diese ZNS Bereiche zu untersuchen, wurden vor der histologischen Auswertung der verschiedenen Färbungen sogenannte „regions of interest“ (ROIs) definiert. In dieser Arbeit wurden die Hirnregionen 215 auf Höhe der vorderen Kommissur und 265 auf Höhe des rostralen Hippocampus der Versuchstiere untersucht. Die ROIs für das Cuprizone- und Cup/EAE-Modell sind in Abb. 10 dargestellt.

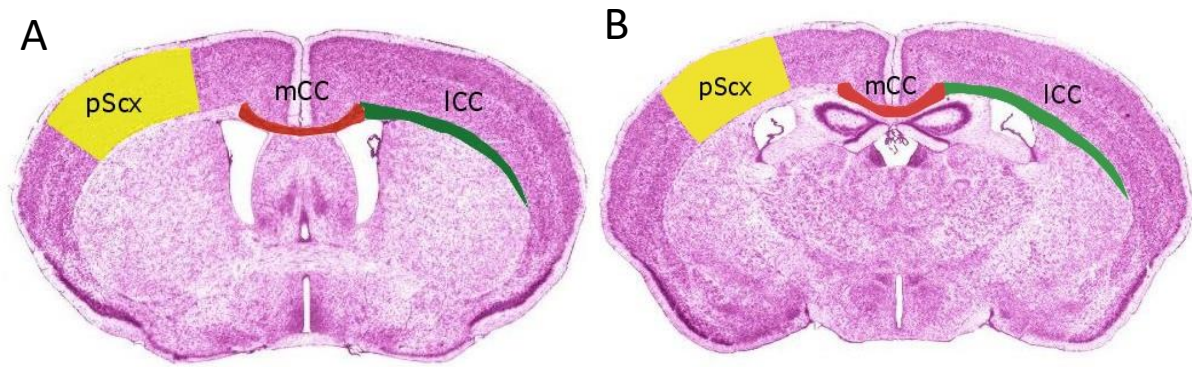


Abb. 10 Untersuchte ROIs im Cuprizone- und Cup/EAE-Modell.

pScx: primär Somatosensorischer Kortex; mCC: mediales Corpus Callosum; ICC: laterales Corpus Callosum. **A** H.E. Färbung der Region 215 mit markierten ROIs pScx, mCC, ICC. **B** H.E. Färbung der Region 265 mit markierten ROIs pScx, mCC, ICC.

2.6.2 Beurteilung und Auswertung der einzelnen Versuche

Die histologisch bearbeiteten Schnitte wurden mit Kameras und integriertem Scanprogramm digitalisiert und als Tiff- bzw. WSI-Datei gespeichert. Jede digitalisierte Datei wurde mit Zahlencodes verblindet und anschließend ausgewertet. Durch die Verblindung des Datensatzes, konnten die Untersucher nicht wissen welches Tier ausgewertet wurde und somit konnte eine unverzerrte Auswertung der Daten gewährleistet werden. Jeder Versuch wurde doppelt ausgewertet, um die Reproduzierbarkeit der Daten zu untersuchen.

2.6.2.1 Luxol Fast Blue/PAS Färbung der Großhirnschnitte

Es wurde jeweils ein Hirnschnitt aller Tiere der Kontrollgruppe (n = 5, TN456-460), der Cup/Veh-Gruppe (n = 11, TN461-465, TN471-474, TN484) und Cup/Laq-Gruppe (n = 10, TN466-470, TN476-480) der Region 215 und Region 265 mit der LFB/PAS Färbung histologisch aufgearbeitet. Insgesamt wurden jeweils 26 Schnitte der Region 215 und 265 gefärbt. Ein Gewebeschnitt der Kontrollgruppe der Region 215 und der Region 265 wurde mikroskopiert und mit der Kamera MQD42070 (ID 106910-09, Basler AG, Ahrensburg, Deutschland) und dem Manual WSI Scanner (1.000 für Windows, Microvisioneer, Freising, Deutschland) aufgenommen.

Für die Region 215 wurde eine Staging-Methode zur Beurteilung der Myelinisierung des ICC entwickelt. Hierfür wurden beide Gehirnhemisphären in fünf Stages à 18° aufgeteilt. Mittels dieser Vorlage wurden alle 26 Schnitte mikroskopiert und entsprechend mit einem Zahlenwert

von 1 - 5 bewertet. Diese Auswertung wurde für beide Hemisphären an zwei unterschiedlichen Tagen durchgeführt und gemittelt (Abb. 11).

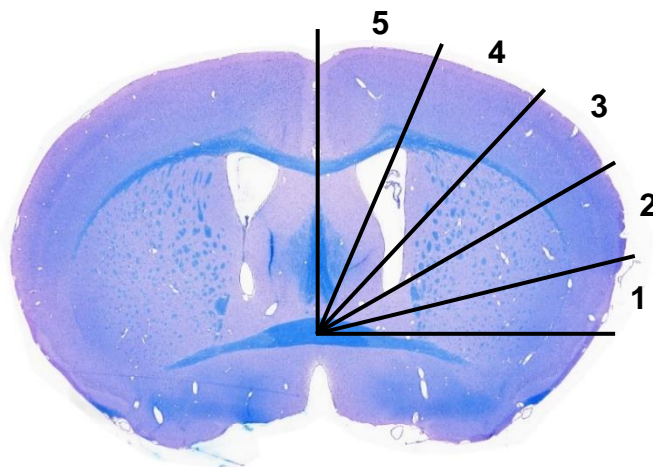


Abb. 11 Schematische Darstellung der Staging-Methode der LFB/PAS Färbung, Region 215.

Mit der Datei der Region 265 wurde eine weitere Staging-Methode entwickelt. In den 26 Gewebeschnitten der Region 265 war die Demyelinisierung im mCC zwischen der Veh- und Laq-Gruppe sehr unterschiedlich (Abb. 12 **A**, **B**). Für die Methode wurden die Objektträger verblindet und in Bezug auf ihren Myelinisierungsgrad im mCC in eine Reihe sortiert. Begonnen wurde mit Schnitten mit starker Myelinisierung bis zu Schnitten mit kaum vorhandener Myelinisierung.

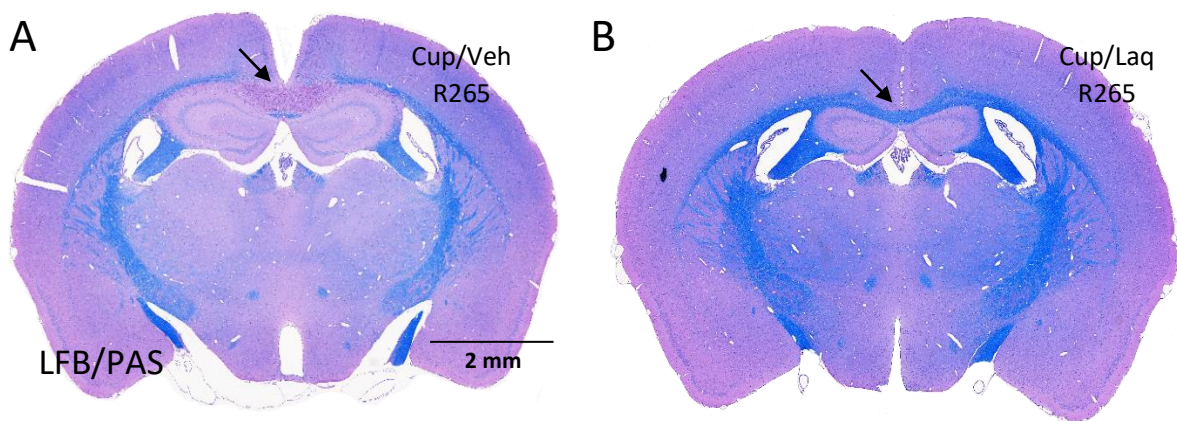


Abb. 12 Immunhistochemischer Nachweis von LFB/PAS, Region 265.

A LFB/PAS Färbung in Cup/Veh-Mäusen [TN462]. **B** LFB/PAS Färbung in Cup/Laq-Mäusen [TN478]. Die Pfeile in Bild **A** und **B** kennzeichnen das mCC.

2.6.2.2 Anti-PLP Färbung

Jeweils ein Gewebeschnitt der Region 265 jedes Versuchstiers der Gruppe A, B und C (Ko n = 5, Cup/Veh n = 11, Cup/Laq n = 10) wurden gegen PLP gefärbt. PLP ist ein Protein der Myelinscheide im ZNS und wurde zur Beurteilung der Myelinisierung verwendet. Zur Messung der anti-PLP Färbeintensität im mCC wurde eine densitometrische Messung durchgeführt. Hierfür wurden alle 26 histologisch aufgearbeiteten Schnitte mit dem Zeiss Mirax Midi Scanner (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland) aufgenommen, als Tiff-Datei gespeichert, verblindet und mit dem ImageJ Programm (Version 1.50i für Windows, National Institute of Health, USA) bearbeitet.

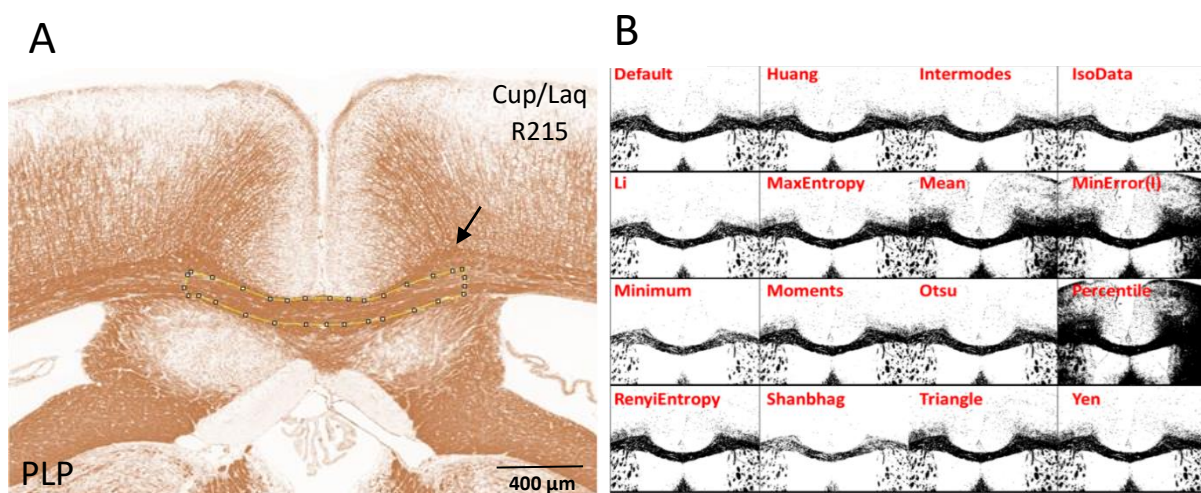


Abb. 13 PLP Auswertung, Region 265.

A Darstellung der ROI „mCC“ in Cup/Laq-Mäusen. **B** Darstellung des Autothresholds des Programms ImageJ. Der Pfeil im Bild **A** kennzeichnet das Cingulum der linken Hemisphäre.

Im ersten Schritt wurden die 26 histologischen Bilder in das ImageJ Programm importiert und in eine „8-bit-Graustufen“-Datei umgewandelt. Danach wurde in jeder Datei die individuelle ROI manuell umrandet und abgespeichert (Abb. 13 **A**). Die ROI „mCC“ wurde als Fläche des CCs zwischen beiden Cinguli (Markierung Pfeil) definiert (Abb. 13 **A**). Um alle histologischen Bilder unter den gleichen Bedingungen auszuwerten, wurde ein einheitlicher Schwellenwert (Threshold) für die Auswertung verwendet. Hierfür wurde die Funktion Autothreshold an jeweils einer helleren und dunkleren Datei jeder Gruppe angewendet. Bei dieser Funktion wendete das Programm 16 Schwarzweiß-Thresholds an und es wurde der passendste Threshold für die drei Gruppen ausgesucht (Abb. 13 **B**). Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu testen, wurden zwei Thresholds (Default & Moments) verwendet und verglichen.

2.6.2.3 Anti-IBA1 Färbung

„Ionizing calcium-binding adaptor molecule 1“ (IBA1) ist ein Protein, das vor allem in Mikrogliazellen aber auch in Monozyten exprimiert und bei Aktivierung dieser Zellen hochreguliert wird. Die Schnitte der Region 215 und 265 der 26 Versuchstiere der Gruppe A, B und C (Ko n = 5, Cup/Veh n = 11, Cup/Laq n = 10) wurden gegen IBA1 histologisch gefärbt.

Um die Anzahl an aktivierten Mikrogliazellen im ICC der Region 215 zu bestimmen, wurden alle 26 Schnitte mit der Kamera MQD42070 und dem Manual WSI Scanner aufgenommen. Um die histologischen Bilder vergleichen zu können, wurde jedes Bild unter den gleichen Bedingungen (20x, Pixelgröße 5,86 μm , Kameraadapter Vergrößerung: 0,7, Weißabgleich durchgeführt) aufgenommen. Die WSI-Dateien wurden verblindet und konnten mit Hilfe des View Point Online Programms (Version 1.0.0.8 für Windows, PreciPoint GmbH, Freising, Deutschland) geöffnet und bearbeitet werden.

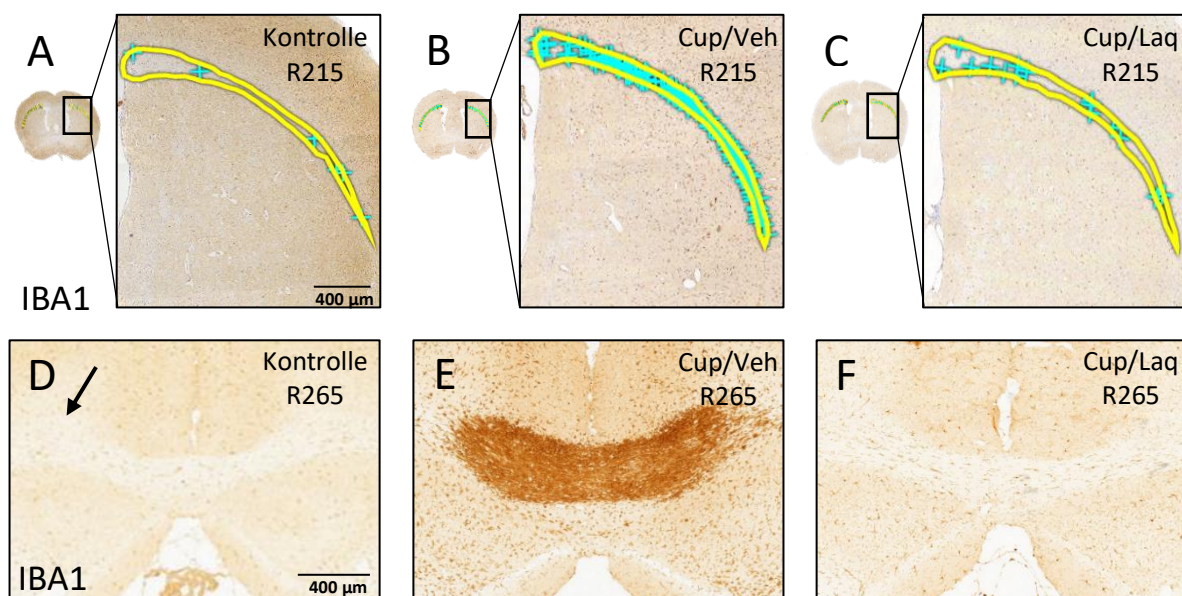


Abb. 14 Bestimmung der Mikrogliazellichte in Anti-IBA1 Färbungen.

A Anti-IBA1-Zellzählung im ICC mittels ViewPoint Online in Kontrollmäusen [TN458], Region 215. **B** Anti-IBA1-Zellzählung mittels Viewpoint in Cup/Veh-Mäusen [TN463], Region 215. **C** Anti-IBA1-Zellzählung mittels Viewpoint in Cup/Laq-Mäusen [TN467], Region 215. **D** Detailansicht des mCC in Kontrollmäusen [TN459], Region 265. **E** Detailansicht des mCC in Cup/Veh-Mäusen [TN461], Region 265. **F** Detailansicht des mCC in Cup/Laq-Mäusen [TN467], Region 265. Der Pfeil im Bild **D** kennzeichnet das Cingulum der rechten Hemisphäre.

Das ICC wurde als ROI in jeder Datei manuell umrandet und seine Fläche (mm^2) bestimmt. Anschließend wurden alle positiv gefärbten Zellen markiert und gezählt. Aus der Anzahl der markierten Zellen und der Fläche wurde ein Quotient gebildet, der die Dichte der Zellen widerspiegelte (Abb. 14 **A, B, C**).

Um das mCC der Region 265 auszuwerten, wurde eine weitere Staging-Methode mit 5 Stages (0, 1, 2, 3, 4) entwickelt. Hierfür wurden die Objektträger verblindet und mikroskopiert. Als mCC wurde die Region zwischen beiden Cinguli (Pfeil Markierung) definiert (Abb. 14 **D**). Das Stage 0 wurde vergeben, wenn sich keine positiven Mikrogliazellen im mCC befanden. Im Gegensatz dazu wurde das Stage 4 vergeben, wenn das mCC voll mit positiven Mikrogliazellen durchsetzt war (Abb. 14 **D, E, F**).

2.6.2.4 Anti-MAC-3 Färbung

MAC-3 ist ein Glykoprotein, dass von Makrophagen und Mikrogliazellen produziert wird und dient als Aktivitätsmarker für Makrophagen und Mikrogliazellen. Die Schnitte der Region 215 und 265 der 26 Versuchstiere der Gruppe A, B und C (Ko n = 5, Cup/Veh n = 11, Cup/Laq n = 10) wurden gegen MAC-3 histologisch gefärbt.

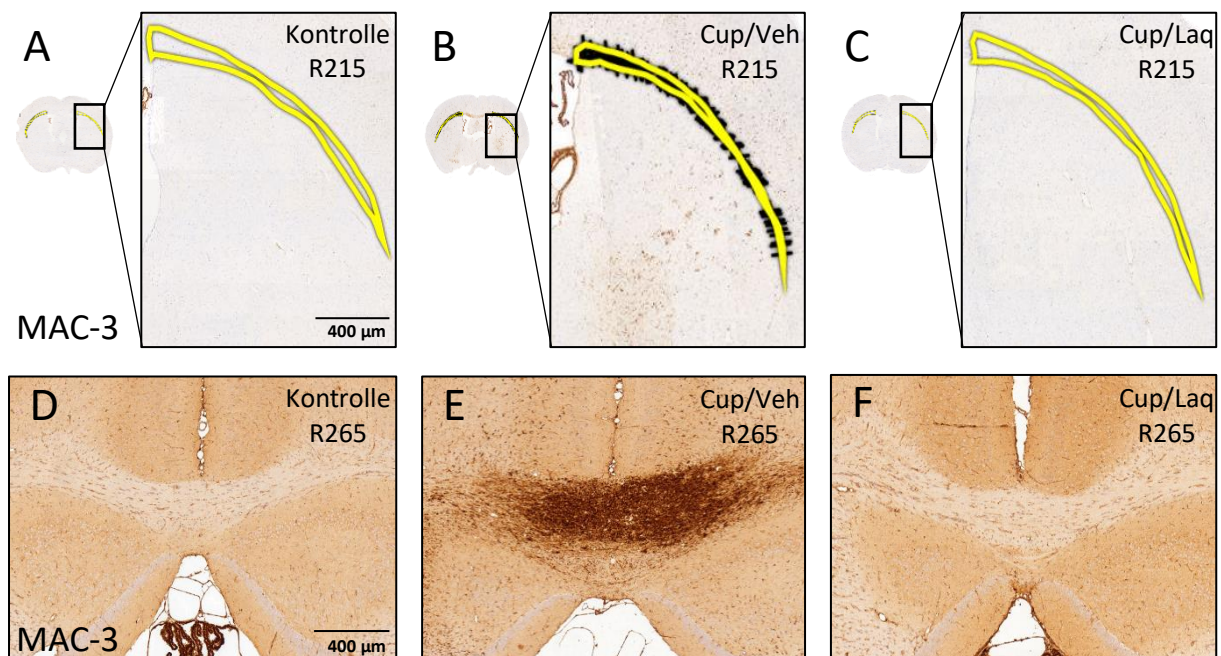


Abb. 15 Bestimmung der Mikrogliazelldichte in Anti-MAC-3 Färbungen, Region 215 und Region 265.

A ROI ICC in Kontrollmäusen [TN458], Region 215. **B** ROI ICC in Cup/Veh-Mäusen [TN472], Region 215. **C** ROI ICC in Cup/Laq-Mäusen [TN468], Region 215. **D** Detailansicht mCC in Kontrollmäusen [TN459], Region 265. **E** Detailansicht mCC in Cup/Veh-Mäusen [TN465], Region 265. **F** Detailansicht mCC in Cup/Laq-Mäusen [TN479], Region 265.

Die Objektträger der Region 215 wurden mit der Kamera MQD42070 und dem Manual WSI Scanner aufgenommen und entsprechend des Verfahrens der IBA1-Auswertung behandelt (Abb. 15 **A, B, C**). Die histologischen Schnitte der Region 265 der Kontroll-, Cup/Veh- und Cup/Laq-Gruppe variierten stark im Myelinisierungsgrad des mCC, welcher densitometrisch

ausgewertet wurde. Alle 26 histologisch aufgearbeiteten Schnitte wurden mit dem Zeiss Mirax Midi Scanner aufgenommen, als Tiff-Datei gespeichert und mit dem ImageJ Programm entsprechend des Auswertungsverfahrens der anti-PLP Färbung ausgewertet. Um die Reproduzierbarkeit der Daten zu testen, wurden zwei Thresholds (Yen und Moments) angewendet.

2.6.2.5 Quantifizierung von [^{18}F]-GE-180 im PET-CT

Der TSPO Ligand GE180 ist ein 18 kDa schweres Transportprotein, das auf der äußeren Mitochondrienmembran von aktivierten Mikrogliazellen und Astrozyten exprimiert wird (Nack et al., 2019). Eine erhöhte TSPO-Expression im ZNS der Versuchstiere kennzeichnet eine Mikrogliaaktivierung (Crawshaw and Robertson, 2017).

Zur Bestimmung der aktivierten Mikrogliazellen wurde die TSPO-Expression [kBq/cc] im mCC und ICC der Versuchstiere bestimmt. Dafür wurde in der fünften Versuchswoche von vier Mäusen pro Kontroll-, Cup/Veh-, und Cup/Laq-Gruppe in-vivo eine Positron-Emissions-Tomographie mit Computer-Tomographie (PET-CT) durchgeführt. Die Messungen wurden mit einem Siemens Inveon DPET (Siemens, Knoxville, Tennessee) durchgeführt und folgten standardisierten Protokollen für Radiochemie (Brendel et al., 2016). Die Aktivität der zerebralen Mikrogliazellen wurde mit dem Tracer [^{18}F]-GE-180 ($11,8 \pm 2,2$ MBq) mit einem Emissionsfenster von 60 - 90 min p.i. gemessen. Hierfür wurden die zwölf Versuchstiere nacheinander in einen Glaskolben gesetzt und mit Isofluran inhalativ narkotisiert. Zur Injektion des radioaktiv markierten Tracers wurde die laterale Schwanzvene der Versuchstiere punktiert und 200 μl Lösung appliziert. Es wurde je ein Scan in der R215 und der R265 aufgenommen. Die Höhe der Expression wurde in kBq/cc gemessen und die Ergebnisse mit dem Programm PMOD (V3.5, PMOD Technologies, Basel, Schweiz) analysiert. Die TSPO Werte aus zwei verschiedenen „Volumes of interest“ (VOIs) (mCC = $7,7 \text{ mm}^3$, analog zur R265 ROI und ICC = $3,7 \text{ mm}^3$, analog zur R215 ROI) wurden extrahiert und die drei Gruppen untereinander verglichen. Für die statistische Auswertung zwischen den drei Gruppen (Kontroll-, Cup/Veh-, Cup/Laq-Gruppe) wurde ein Kruskal-Wallis-Test verwendet.

2.6.2.6 Luxol-Fast-Blue/PAS Färbung des Rückenmarks

Zur Bestimmung der inflammatorischen Demyelinisierung im Rückenmark der Versuchstiere wurden zwei Rückenmarkspräparate jedes Tiers der CupEAE/Veh- (n = 5, TN485-489) und CupEAE/Laq-Gruppe (n = 5, TN490-494) gegen LFB/PAS gefärbt.

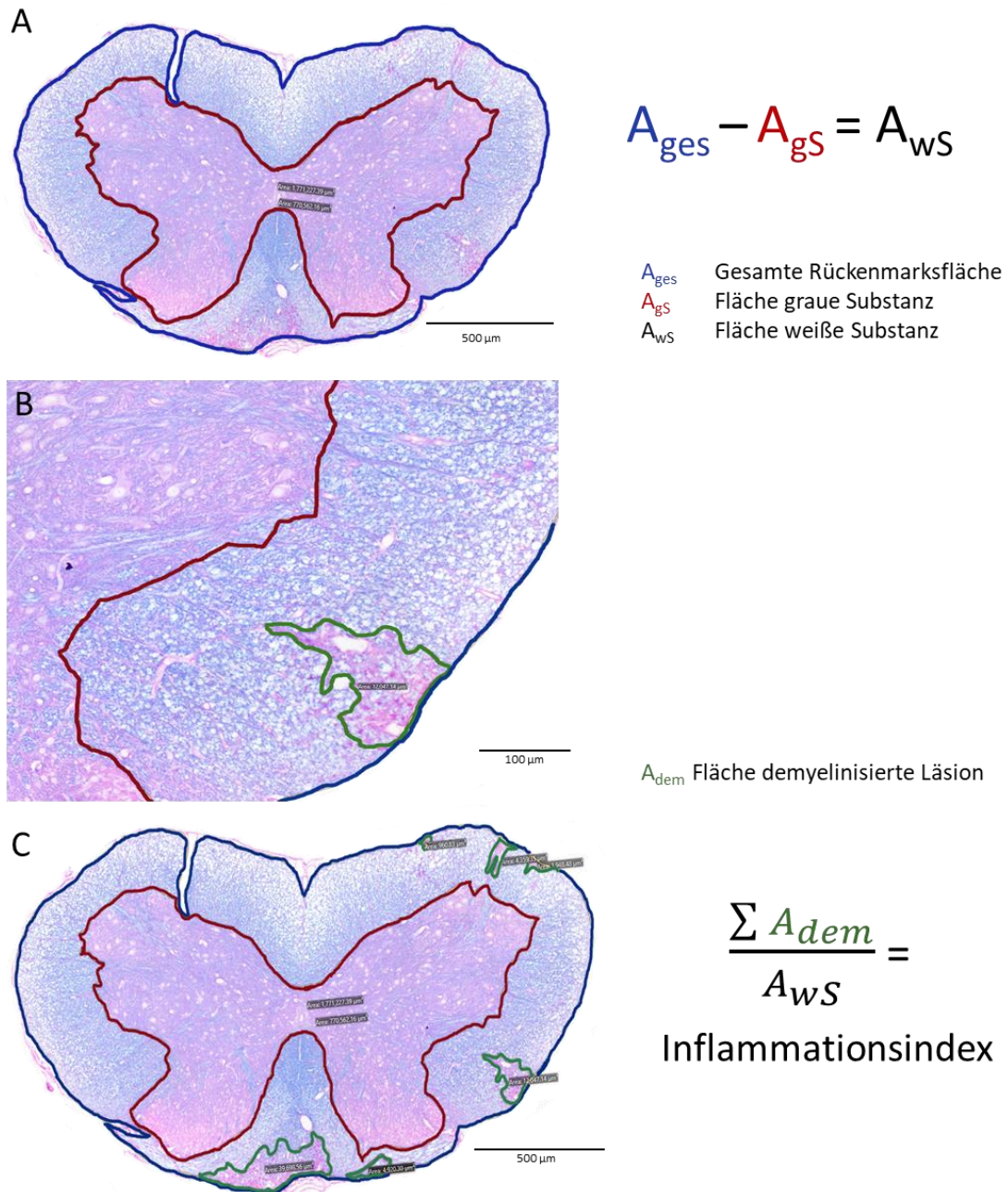


Abb. 16 Bestimmung des inflammatorischen Index im Rückenmark [TN487].

A Bestimmung der gesamten Rückenmarksfläche und der grauen Substanz. Berechnung der weißen Substanz als Subtraktion der gesamten Rückenmarksfläche minus der grauen Substanz. **B** Flächenbestimmung einer Region mit entzündlicher Demyelinisierung. **C** Darstellung der gesamten Rückenmarksfläche, der grauen Substanz und sechs Regionen mit inflammatorischer Demyelinisierung. Berechnung des Inflammationsindex als Quotient aus der Summe der demyelinisierten Läsionen geteilt durch die weiße Substanz.

Im ersten Schritt wurde die gesamte Rückenmarksfläche (A_{ges}) und die graue Substanz (A_{gs}) der zehn Versuchstiere gemessen. Als Subtraktion der gesamten Rückenmarksfläche minus der grauen Substanz wurde die weiße Substanz (A_{ws}) bestimmt (Abb. 16 **A**). Im nächsten Schritt wurde die Fläche einzelner demyelinisierter Areale (A_{dem}) bestimmt (Abb. 16 **B**). Demyelinisierte Areale kennzeichneten sich durch den Verlust von LFB Farbstoff. Der Inflamationsindex berechnete sich aus der Summe der demyelinisierten Läsionen ($\sum A_{dem}$) in Bezug auf die weiße Substanz des Rückenmarks (Abb. 16 **C**).

2.6.2.7 H.E. Färbung

Die Schnitte der Region 215 und 265 der CupEAE/Veh- (n = 5, TN 485-489) und CupEAE/Laq-Gruppe (n = 5, TN490-494) wurden mit der H.E. Färbung histologisch aufgearbeitet. Mit Hilfe dieser Übersichtsfärbung wurden die inflammatorischen Bereiche in Form von PVCs quantifiziert. Venöse Blutgefäße mit deutlicher Anhäufung von Zellen im perivaskulären Raum wurden als PVC definiert (Abb. 17 **A**).

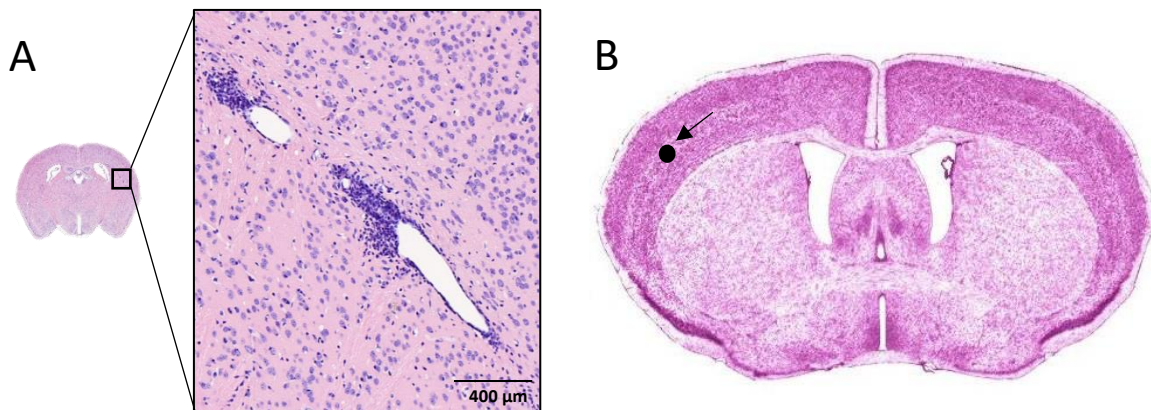


Abb. 17 Auswertung der PVCs.

A Detailansicht eines PVC aus CupEAE/Veh-Mäusen [TN485], Region 265. **B** Auswertmethode der HE Schnitte. Der Pfeil kennzeichnet ein PVC im rechten Kortex von CupEAE/Laq-Mäusen [TN490], Region 215.

Zur Quantifizierung der PVCs wurde das Bild der Region 215 des Sidman Mouse Brain Atlas als Vorlage für jedes Tier (TN485-494) einmal ausgedruckt und darin die PVCs gekennzeichnet. Die Objektträger wurden verblindet, mikroskopiert und die PVCs in der Vorlage des Sidman Mouse Brain Atlas markiert und quantifiziert (Abb. 17 **B**). Das gleiche Verfahren wurde für die Region 265 durchgeführt.

2.6.2.8 Anti-CD4 Färbung

„Cluster of Differentiation 4“ (CD4) ist ein Co-Rezeptor, welcher auf der Oberfläche von T-Helferzellen, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten sowie B-Zellen exprimiert wird. In gesundem Hirngewebe sollten keine CD4⁺-Zellen aufzufinden sein. Mit der EAE-Immunisierung bilden sich autoreaktive T-Zellen, die ins ZNS immigrieren und mit Hilfe der anti-CD4 Färbung detektiert werden können.

Ein Objektträger jedes Tiers der Region 215 und Region 265 der CupEAE/Veh- (n = 5, TN485-489) und CupEAE/Laq-Gruppe (n = 5, TN490-494) wurde histologisch gegen CD4 gefärbt. Es wurden der primär somatosensorische Kortex (pScx) und das mCC zur CD4-Zell Quantifizierung ausgewählt. Die 20 Schnitte wurden mit der Kamera MQD42070 und dem Manual WSI Scanner aufgenommen, verblindet und mit dem View Point Online Programm bearbeitet. Die ROI (pScx, mCC) wurde manuell umrandet, die Fläche (mm²) bestimmt und die CD4⁺-Zellen quantifiziert (Abb. 18 A, B).

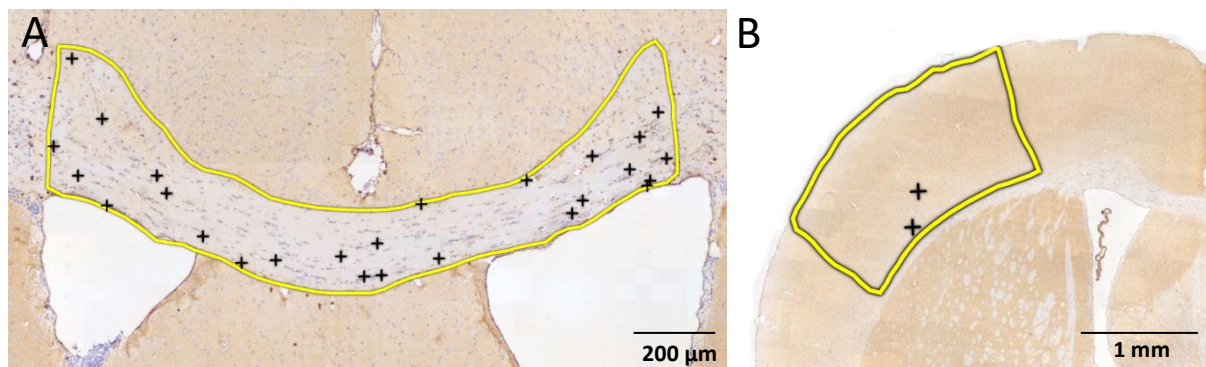


Abb. 18 Quantifizierung der CD4⁺-Zellen, Region 215.

A CD4-Zellzählung in der ROI mCC von CupEAE/Veh-Mäusen [TN487]. **B** CD4-Zellzählung in der ROI pScx von CupEAE/Laq-Mäusen [TN491]. Die Kreuze markieren CD4⁺-Zellen.

2.7 Statische Darstellung und Auswertung

Die erhobenen Daten wurden mit dem Programm GraphPad Prism (Version 7.0c für Mac, GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA) statistisch ausgewertet und grafisch dargestellt.

Für den Vergleich der Kontroll-, Cup/Veh- und Cup/Laq-Gruppe wurde eine Varianzanalyse (engl. analysis of variance ANOVA) durchgeführt. Da es sich hierbei um nichtparametrische, ordinalskalierte Daten handelte, wurde beim Vergleich der drei Gruppen ein Kruskal-Wallis-Test gefolgt von einem „Dunn’s multiple comparison Test“ angewendet. Um die CupEAE/Veh- und CupEAE/Laq-Gruppe auf ihre Signifikanz zu untersuchen, wurde ein ungepaarter Mann-Whitney-Test angewendet. Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (engl. Standard Error of the Mean SEM) angegeben. Bei Erreichen des Signifikanzwertes ($p < 0,05$) wurde der Versuch als signifikant gewertet (* $0.010 \leq p < 0.05$, ** $0.001 \leq p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0,0001$). Der angewendete statistische Test ist in der entsprechenden Abbildungsbeschreibung und der dazugehörigen Tabelle des jeweiligen Versuchs genannt.

Zur Auswertung des Zusammenhangs zwischen Demyelinisierung und Mikrogliose wurden die Werte der LFB/PAS Stages und die Dichte der IBA1⁺-Zellen von zehn Versuchstieren (Cup/Veh-Gruppe $n = 5$, Cup/Laq-Gruppe $n = 5$) auf ihre Korrelation getestet. Es wurde von einer einfachen linearen Regression von zwei metrischen Größen X und Y ausgegangen. Zur Berechnung der linearen Regression wurden die Werte auf die Ordinate und Abszisse aufgetragen und eine Ausgleichsgerade durch die Punktwerte gelegt. Mit dieser Ausgleichsgerade sollte der lineare Zusammenhang zwischen X und Y möglichst gut beschrieben werden. Für die Gerade ergab sich eine Steigung von $318,1 \pm 90,11$ und ein Wert von $Y = -507,6 \pm 293,0$ bei $X = 0$. Es zeigte sich ein linearer Zusammenhang (** $p = 0,0077$) zwischen Demyelinisierung und Mikrogliose (Abb. 22).

3 Ergebnisse

In diesem Kapitel sind die Ergebnisse der Immunhistochemischen Färbungen und die statistische Auswertung der Daten dargestellt. In Kapitel 3.1 ist der Vergleich der Versuchsgruppe A, B und C erläutert. In Kapitel 3.2 sind dahingegen die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen D und E ausformuliert.

3.1 Vergleich der Kontroll-, Cup/Veh- und Cup/Laq-Gruppe

Im ersten Teil des Experiments wurde die Cuprizone-induzierte intrinsische Neurodegeneration in der Cup/Veh- und Cup/Laq-Gruppe verglichen. Diese intrinsische Neurodegeneration wurde mit Hilfe der LFB/PAS, anti-PLP, anti-IBA1 und anti-MAC-3 Färbung untersucht und die Ergebnisse in den folgenden Kapiteln dargestellt.

3.1.1 Luxol Fast Blue/PAS Färbung

Mit der LFB/PAS Färbung wurde eine durch Laquinimod verursachte potenzielle Protektion von Oligodendrozyten und folglich verminderte Demyelinisierung im Cuprizone-Modell untersucht.

Die Ergebnisse der Region 215 sind in Abb. 19 **A - D** dargestellt. In den Kontrollschnitten wurde ein hypo- bis normozelluläres Bild mit deutlicher Myelinisierung im CC und im Striatum beobachtet (Pott et al., 2009). Im Vergleich dazu führte die Cuprizone-Intoxikation in Cup/Veh-Schnitten auf Höhe der vorderen Kommissur (Region 215) zu einem hyperzellulärem Bild mit deutlicher Demyelinisierung im ICC und im Striatum. Wie in Abb. 19 **A** dargestellt, kam es im Bereich des ICC der Cup/Veh-Gruppe zur Abnahme der LFB/PAS Färbeintensität. Die Laquinimod-Behandlung reduzierte die Cuprizone-induzierte Demyelinisierung und führte zu einem normozellulären Bild mit deutlicher Myelinisierung des ICC (Abb. 19 **A**). Das Staging des Myelinisierungsgrades des ICC der beiden Hirnhemisphären wurde an zwei unterschiedlichen Tagen durchgeführt und gemittelt. Dabei ergab sich ein Mittelwert von $1,9 \pm 0,10$ für die Kontrollgruppe, $3,2 \pm 0,19$ für die Cup/Veh-Gruppe und $2,2 \pm 0,13$ für die Cup/Laq-Gruppe. Im Kruskal-Wallis-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($***p = 0,0008$) zwischen den drei Versuchsgruppen (Tab. 13). Zusammenfassend führte die Gabe von Laquinimod zu einer deutlichen Reduktion an Cuprizone-induzierter Demyelinisierung im Striatum und ICC der Versuchstiere auf Höhe der vorderen Kommissur.

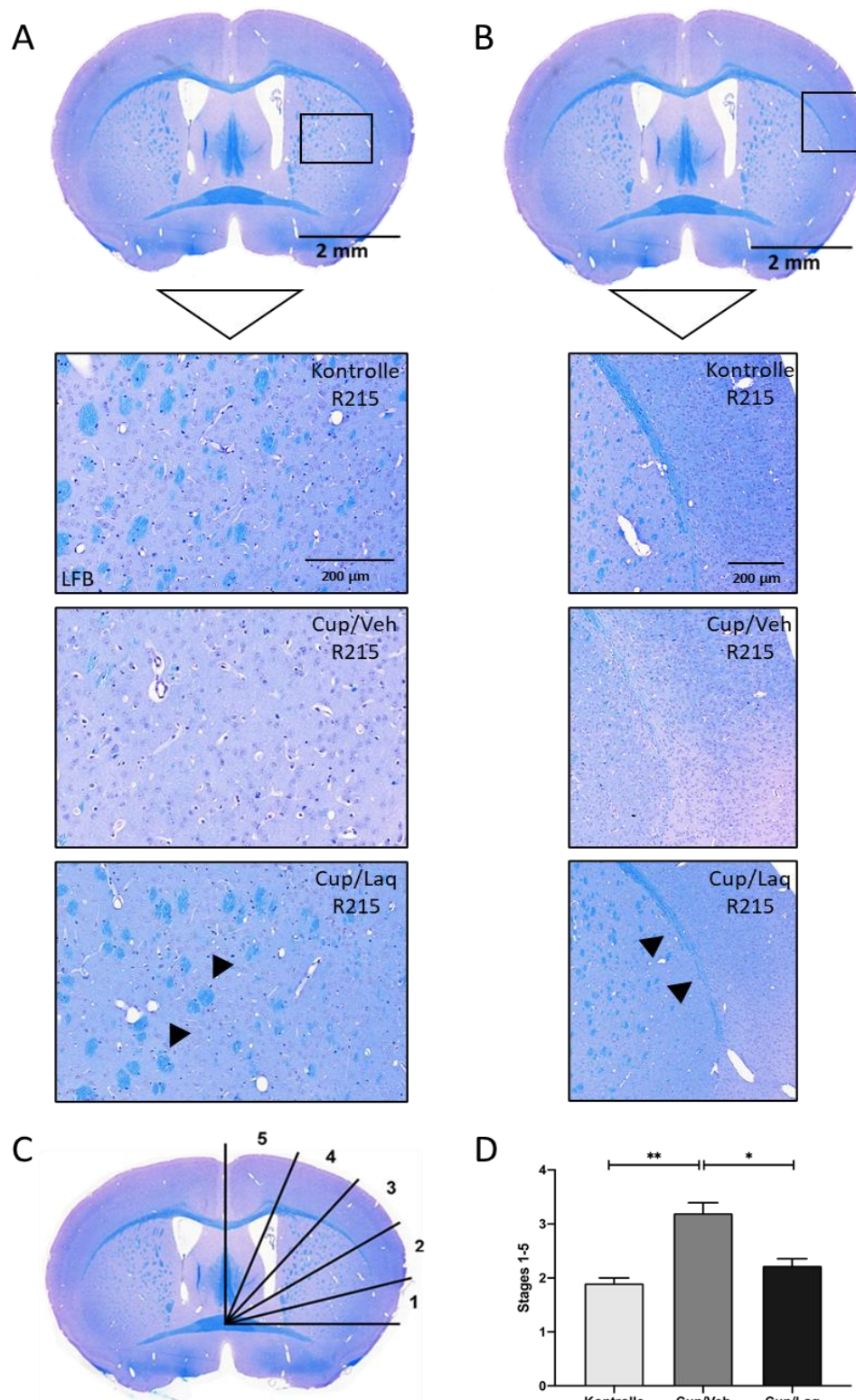


Abb. 19 Immunhistochemischer Nachweis von LFB/PAS in der Kontroll-, Cup/Veh- und Cup/Laq-Gruppe in R215.

A LFB/PAS Färbung in repräsentativen Ausschnitten des Striatums im Frontalschnitt der Kontroll- [TN456], Cup/Veh- [TN471] und Cup/Laq-Gruppe [TN467]. Die Pfeilspitzen markieren myelinisierte Bereiche im Striatum der Cup/Laq-Gruppe. **B** LFB/PAS Färbung in repräsentativen Ausschnitten des ICC im Frontalschnitt der Kontroll- [TN456], Cup/Veh- [TN471] und Cup/Laq-Gruppe [TN467]. Pfeilspitzen markieren myelinisierte Bereiche des ICC. **C** Staging Methode des linken ICCs in 5 Stages à 18°. **D** Grafische Auswertung der Staging Methode des ICC in der Kontroll-, Cup/Veh- und Cup/Laq-Gruppe. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mittels Kruskal-Wallis-Test, gefolgt von einem Dunns-Test, auf statistische Signifikanz geprüft; **p = 0,0019 für Ko vs. Cup/Veh, *p = 0,019 Cup/Veh vs. Cup/Laq.

Tab. 13 Zusammenfassung der Staging Ergebnisse der LFB/PAS Färbung, Region 215

Angabe als Mittelwert \pm SEM. [†] Kruskal-Wallis-Test

Versuchsgruppen	Kontrolle	Cup/Veh	Cup/Laq	P
	Mittelwert \pm SEM	Mittelwert \pm SEM	Mittelwert \pm SEM	
ICC, R215	1,9 \pm 0,10	3,2 \pm 0,19	2,2 \pm 0,13	0,0008 [†]

Die Auswertung der Myelinisierung auf Höhe des rostralen Hippocampus (Region 265) ist in Abb. 20 **A, B** dargestellt. Abb. 20 **A** zeigt das mCC von Schnitten der Kontrollgruppe mit starker LFB/PAS Färbeintensität. In Cup/Veh-Schnitten zeigte sich eine deutliche Abnahme der LFB/PAS Färbeintensität im mCC (Abb. 20 **A**). Durch die Laquinimod-Gabe wurde die Cuprizone-induzierte Demyelinisierung im mCC deutlich reduziert. Als Staging Methode für die Region 265 wurden die 26 verblindeten Objektträger mikroskopiert und in eine Reihe in Bezug auf ihren Myelinisierungsgrad im mCC sortiert. Abb. 20 **B** zeigt, dass die Hirnschnitte der Cup/Laq-Gruppe eindeutig identifiziert wurden und als stärker myelinisiert eingeteilt wurden als die Schnitte der Cup/Veh- und Kontrollgruppe.

Die Auswertung der LFB/PAS Färbung zeigte, dass die Laquinimod-Gabe zu einer deutlichen Protektion von Oligodendrozyten und Reduktion an Cuprizone-induzierter Demyelinisierung im CC und Striatum auf Höhe der vorderen Kommissur und auf Höhe des rostralen Hippocampus führt. Um diese neuroprotektive Wirkung auf die Myelinisierung zu bestätigen, wurden die gleichen Hirnregionen im nächsten Schritt gegen das Myelinprotein PLP gefärbt und ausgewertet.

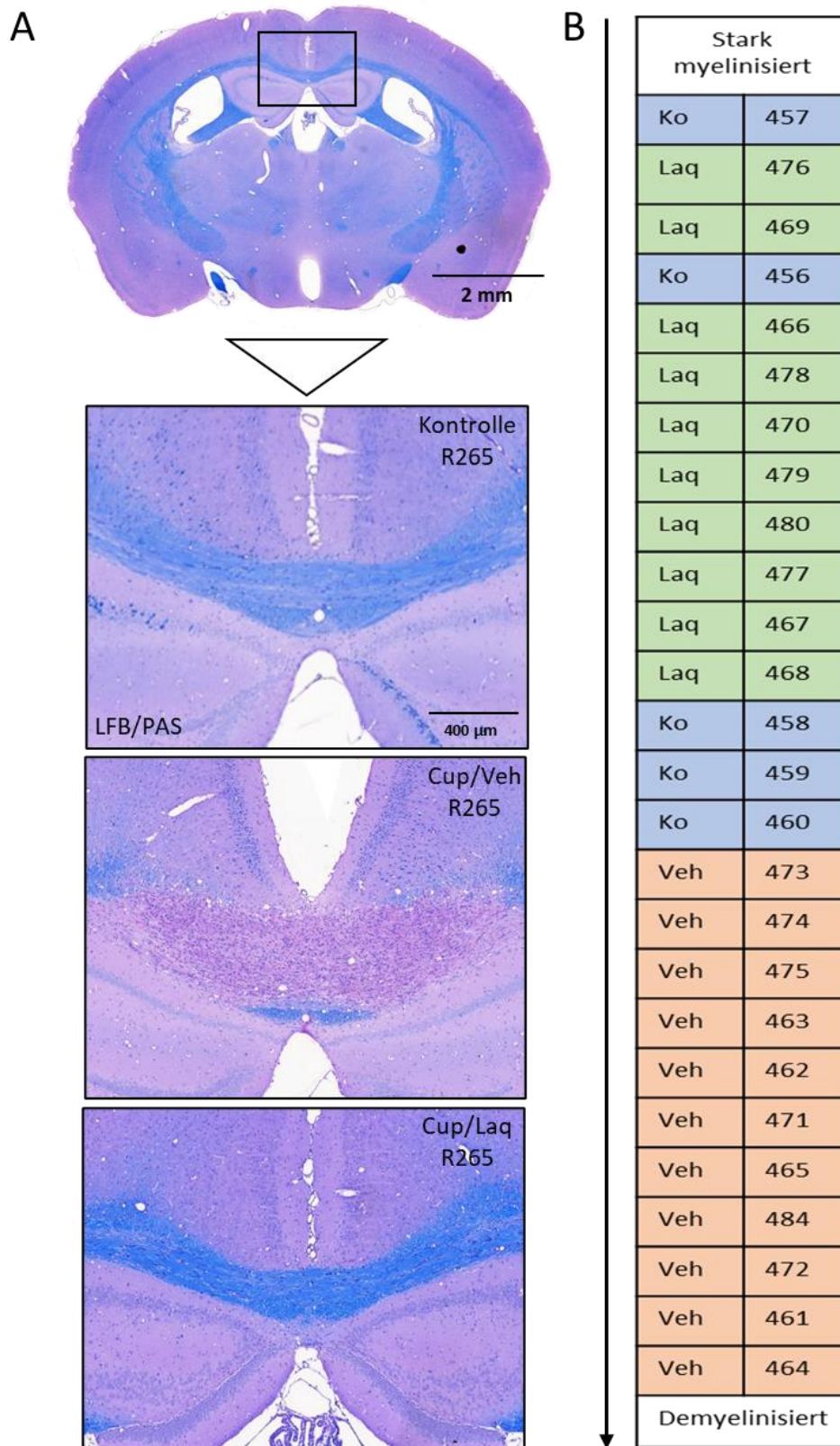


Abb. 20 Immunhistochemischer Nachweis von LFB/PAS in der Kontroll-, Cup/Veh- und Cup/Laq-Gruppe in R265.

A LFB/PAS Färbung in repräsentativen Ausschnitten des mCC im Frontalschnitt der Kontroll- [TN456], Cup/Veh- [TN462] und Cup/Laq-Gruppe [TN478]. **B** Staging Reihe in Bezug auf die Myelinisierung des mCC. Die erste Spalte zeigt die Behandlung der Versuchstiere (Ko = Kontrollgruppe, Laq = Cup/Laq-Gruppe, Veh = Cup/Veh-Gruppe). Die zweite Spalte zeigt die Tiernummer an. Die Schnitte der Cup/Veh-Gruppe wurden eindeutig als stärker demyelinisiert eingestuft als Schnitte der Cup/Laq-Gruppe.

3.1.2 Anti-PLP Färbung

Um den neuroprotektiven Effekt von Laquinimod auf Myelinisierung zu bestätigen, wurde die anti-PLP Färbung verwendet. Bei der Auswertung der Myelinisierung mit Hilfe der anti-PLP Färbung wurde das mCC auf Höhe des rostralen Hippocampus untersucht. Zur Dichtebestimmung der anti-PLP Färbeintensität wurden zwei Thresholds (Default und Moments) angewendet (Abb. 21 **A, B, C** Tab. **14**). Durch diese doppelte Auswertung wurde die Reproduzierbarkeit der Daten kontrolliert. Es ergaben sich ähnliche Werte für beide Thresholds. Im weiteren Verlauf wurde die Auswertung mit dem Threshold „Default“ weiter beobachtet (Abb. 21 **B**).

Tab. 14 Zusammenfassung der Dichtebestimmung im mCC der anti-PLP Färbung, Region 265

Angabe als Mittelwert \pm SEM, Einheit %, [†]Kruskal-Wallis-Test

Versuchsgruppen	Kontrolle	Cup/Veh	Cup/Laq	P
	Mittelwert \pm SEM [%]	Mittelwert \pm SEM [%]	Mittelwert \pm SEM [%]	
mCC, Default	91,94 \pm 4,10	26,77 \pm 2,63	95,88 \pm 1,49	0,0002 [†]
mCC, Moments	93,46 \pm 3,40	29,91 \pm 2,61	96,38 \pm 1,38	0,0002 [†]

In Kontrolltieren zeigte sich eine hohe anti-PLP Färbeintensität mit einem Flächenanteil von 91,94 \pm 4,10 [%] in der ROI mCC (Abb. 21 **A**). Im Vergleich dazu zeigte sich in der Cup/Veh-Gruppe eine deutliche Abnahme an anti-PLP Färbeintensität im mCC mit einem Flächenanteil von 26,77 \pm 2,63 [%] (Abb. 21 **A**). In der Cup/Laq-Gruppe wurden dahingegen eine hohe anti-PLP Färbeintensität im mCC beobachtet und ein Flächenanteil von 95,88 \pm 1,49 [%] bestimmt (Abb. 21 **A**). Im Kruskal-Wallis-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied (**p = 0,0002) zwischen den drei Versuchsgruppen für beide Thresholds (Tab. **14**).

Die deutliche anti-PLP Färbeintensität in Laquinimod-behandelten Tieren im Vergleich zu Vehikel-Tieren bestätigte eine neuroprotektive Wirkung von Laquinimod auf Oligodendrozyten und auf den Erhalt der Myelinisierung des mCC auf Höhe des rostralen Hippocampus. Um den Einfluss von Laquinimod auf die Aktivierung von Mikrogliazellen und Monozyten zu beurteilen, wurden die gleichen Hirnregionen im nächsten Schritt auf die IBA1-Expression untersucht.

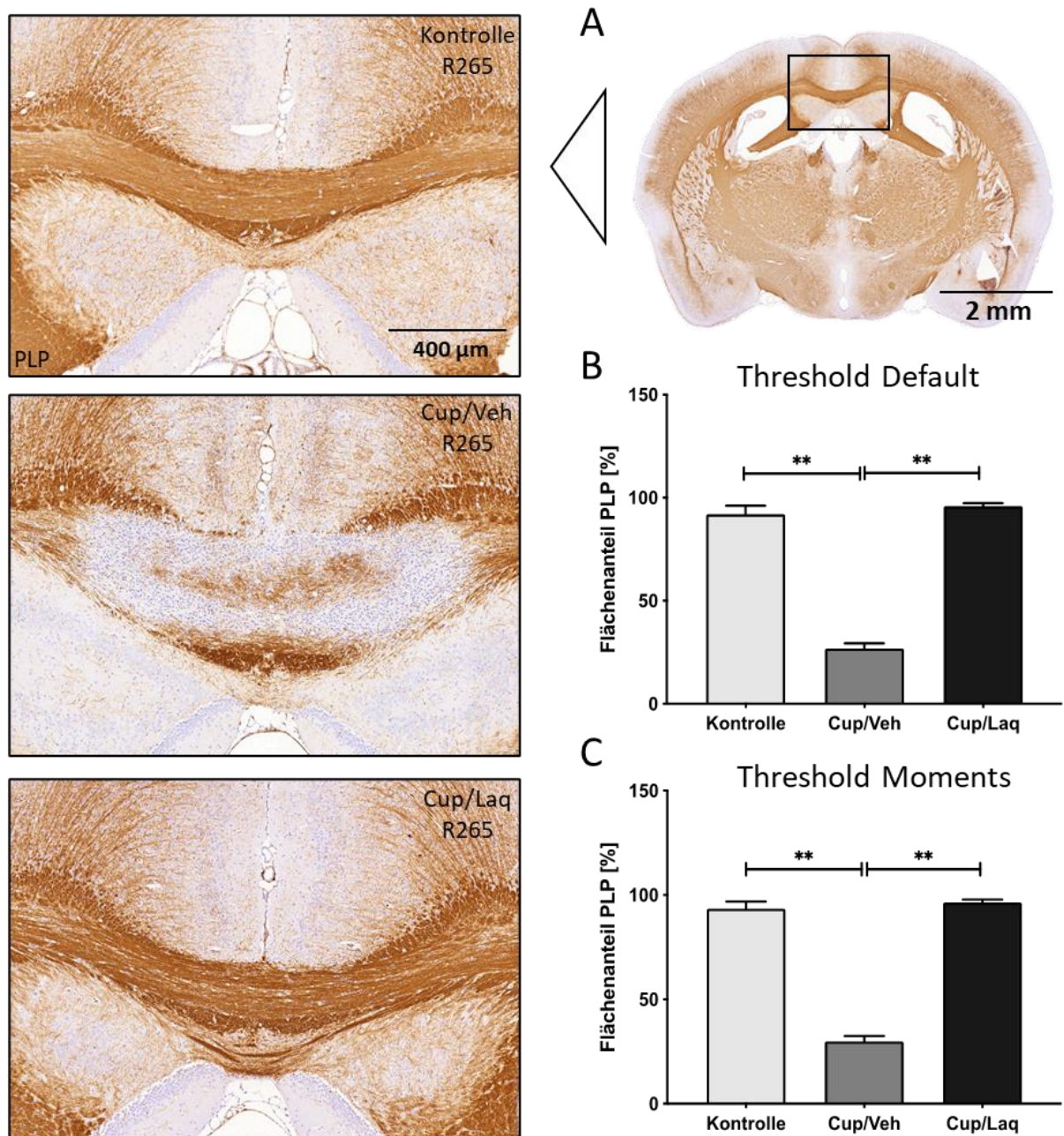


Abb. 21 Immunhistochemischer Nachweis von PLP im mCC der Kontroll-, Cup/Veh- und Cup/Laq-Gruppe in Region 265.

A Anti-PLP Färbung in repräsentativen Ausschnitten des mCC im Frontalschnitt der Kontroll- [TN459], Cup/Veh- [TN465] und Cup/Laq-Gruppe [TN470]. **B** Densitometrische Auswertung zur Bestimmung der anti-PLP Färbeintensität im mCC. Threshold „Default“ wurde angewendet. **C** Densitometrische Auswertung zur Bestimmung der anti-PLP Färbeintensität im mCC. Threshold „Moments“ wurde angewendet. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mittels Kruskal-Wallis-Test, gefolgt von einem Dunns-Test, auf statistische Signifikanz geprüft; $**p < 0,01$ für Ko vs. Cup/Veh und Cup/Veh vs. Cup/Laq für beide Thresholds.

3.1.3 Anti-IBA1 Färbung

Mit Hilfe der histologisch aufgearbeiteten Schnitte der anti-IBA1 Färbung wurden die aktivierten Mikrogliazellen und Monozyten in der Kontroll-, Cup/Veh- und Cup/Laq-Gruppe verglichen. Diese Färbung wurde verwendet, um die durch Laquinimod reduzierte Mikrogliose in Cuprizone-intoxikierten Mäusen zu bestätigen.

In Abb. 23 **A** wurde das ICC der Region 215 der jeweiligen Gruppe detailliert dargestellt. In Kontrolltieren zeigten sich vereinzelte Mikrogliazellen im ICC (Abb. 23 **A**). Im Vergleich dazu zeigten sich im ICC von Versuchstieren der Cup/Veh-Gruppe viele aktivierte Mikrogliazellen. Die Pfeilspitzen markieren aktivierte Mikrogliazellen (Abb. 23 **A**). Die Laquinimod-Gabe führte in Tieren der Cup/Laq-Gruppe zu einer deutlichen Reduktion an aktivierten Mikrogliazellen im ICC (Abb. 23 **A**). Die ROI ICC der Cup/Laq-Gruppe zeigte vergleichbare geringe Anzahl an IBA1⁺-Zellen wie die ROI ICC der Kontrollgruppe. Die statistische Auswertung der IBA1-Zelldichte des ICC ergab einen Wert von $50,34 \pm 10,57$ [1/mm²] für die Kontrollgruppe, $474,00 \pm 86,44$ [1/mm²] für die Cup/Veh-Gruppe und $86,11 \pm 4,29$ [1/mm²] für die Cup/Laq-Gruppe. Der Kruskal-Wallis-Test zeigte einen signifikanten Unterschied (****p < 0,0001) zwischen den drei Versuchsgruppen (Abb. 23 **B**, Tab. 15). Die Laquinimod-Gabe führte in Cuprizone-intoxikierten Mäusen zu einer deutlich reduzierten Mikrogliose im ICC auf Höhe der vorderen Kommissur.

Tab. 15 Zusammenfassung der Ergebnisse der anti-IBA1 Auswertung

Angabe als Mittelwert \pm SEM, Einheit 1/mm², *Kruskal-Wallis-Test, + gilt nur für ICC, R215 und ICC, R265.

Versuchsgruppen	Kontrolle	Cup/Veh	Cup/Laq	P
	Mittelwert \pm SEM [1/mm ²] ⁺	Mittelwert \pm SEM [1/mm ²] ⁺	Mittelwert \pm SEM [1/mm ²] ⁺	
ICC, R215	50,34 \pm 10,57	474,00 \pm 86,44	86,11 \pm 4,29	<0,0001 [†]
ICC, R265	47,78 \pm 10,10	252,00 \pm 35,05	67,20 \pm 7,08	0,0001 [†]
mCC, R265	1,00 \pm 0,00	2,82 \pm 0,23	1,00 \pm 0,00	<0,0001 [†]

Die gleiche Auswertung wurde im ICC der Region 265 der drei Versuchsgruppen durchgeführt. Hier ergab sich ein Wert von $47,78 \pm 10,10$ [1/mm²] für die Kontrollgruppe, $252,00 \pm 35,05$ [1/mm²] für die Cup/Veh-Gruppe und $67,2 \pm 7,08$ [1/mm²] für die Cup/Laq-Gruppe. Der Kruskal-Wallis-Test zeigte einen signifikanten Unterschied (***p = 0,0001) zwischen den drei Versuchsgruppen (Tab. 15). Die Ergebnisse wurden nicht grafisch dargestellt.

In Abb. 23 C ist die anti-IBA1 Färbung im mCC der Region 265 dargestellt. Im mCC der Kontrollgruppe zeigte sich eine helle anti-IBA1 Färbeintensität mit vereinzelt Mikrogliazellen (Abb. 23 C). Im mCC der Cup/Veh-Gruppe zeigte sich eine zellreiche, dunkelgefärbte anti-IBA1 Färbeintensität (Abb. 23 C). In der ROI mCC der Cup/Laq-Gruppe zeigte sich eine deutlich geringere Mikrogliose mit wenigen IBA1⁺-Zellen (Abb. 23 C). Beim Staging der Mikrogliazelldichte des mCC der Region 265 ergab sich für die Cup/Laq-Gruppe und die Kontrollgruppe ein Staging von $1,00 \pm 0,00$. Im Vergleich dazu wurden die Schnitte der Cup/Veh-Gruppe mit einem Mittelwert von $2,8 \pm 0,23$ gestaged (Abb. 23 D, Tab. 15). Die Varianzanalyse ergab einen signifikanten Unterschied (****p < 0,0001) zwischen den drei Versuchsgruppen (Tab. 15).

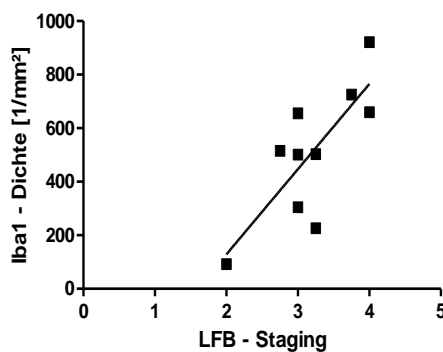


Abb. 22 Lineare Regression zwischen der Demyelinisierung (LFB/PAS) und der Mikrogliaaktivierung (IBA1) in der Region 215.

In Abb. 22 ist die Ausgleichsgerade zwischen der Demyelinisierung (LFB/PAS) und der Mikrogliose (IBA1) dargestellt. Auf der Ordinate des Graphen sind für jeweils fünf Versuchstiere aus der Cup/Veh- und Cup/Laq-Gruppe die Dichte der IBA1⁺-Zellen [1/mm²] im ICC der Region 215 dargestellt. Auf der Abszisse sind die Stages der LFB Färbung der Region 215 der gleichen Versuchstiere aufgetragen. In der Cup/Veh-Gruppe zeigte sich, dass eine starke Mikrogliose (hohe IBA1⁺-Zelldichte) mit starker Demyelinisierung des ICC (hohe LFB/PAS Stages) in Region 215 zusammenhängt. In der Cup/Laq-Gruppe korrelierten geringe Mikrogliose (geringe IBA1⁺-Zelldichte) mit geringer Demyelinisierung des ICC (niedrige LFB/PAS Stages). Die Ergebnisse der linearen Regression zeigten einen signifikanten Zusammenhang (**p = 0,0077) zwischen der Demyelinisierung und Mikrogliose in Vehikel- bzw. Laquinimod-behandelten Tieren (Abb. 22).

Zusammenfassend führte die Laquinimod-Gabe zu Neuroprotektion und deutlich geringerer Mikrogliose im CC auf Höhe der vorderen Kommissur und des rostralen Hippocampus. Im nächsten Schritt wurde die Expression des Aktivitätsmarker MAC-3 auf Makrophagen und Mikrogliazellen untersucht, um die reduzierte Mikrogliose durch Laquinimod zu bestätigen.

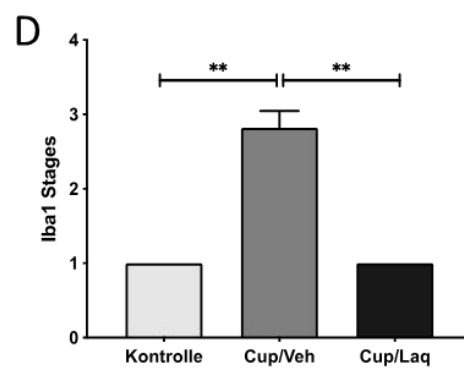
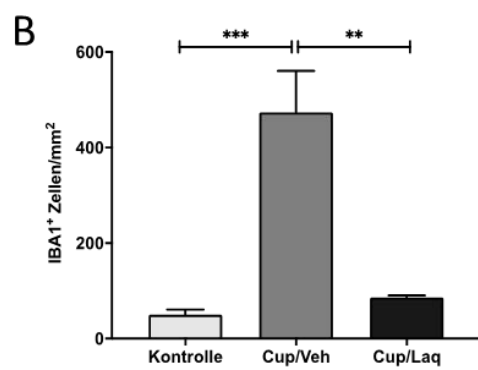
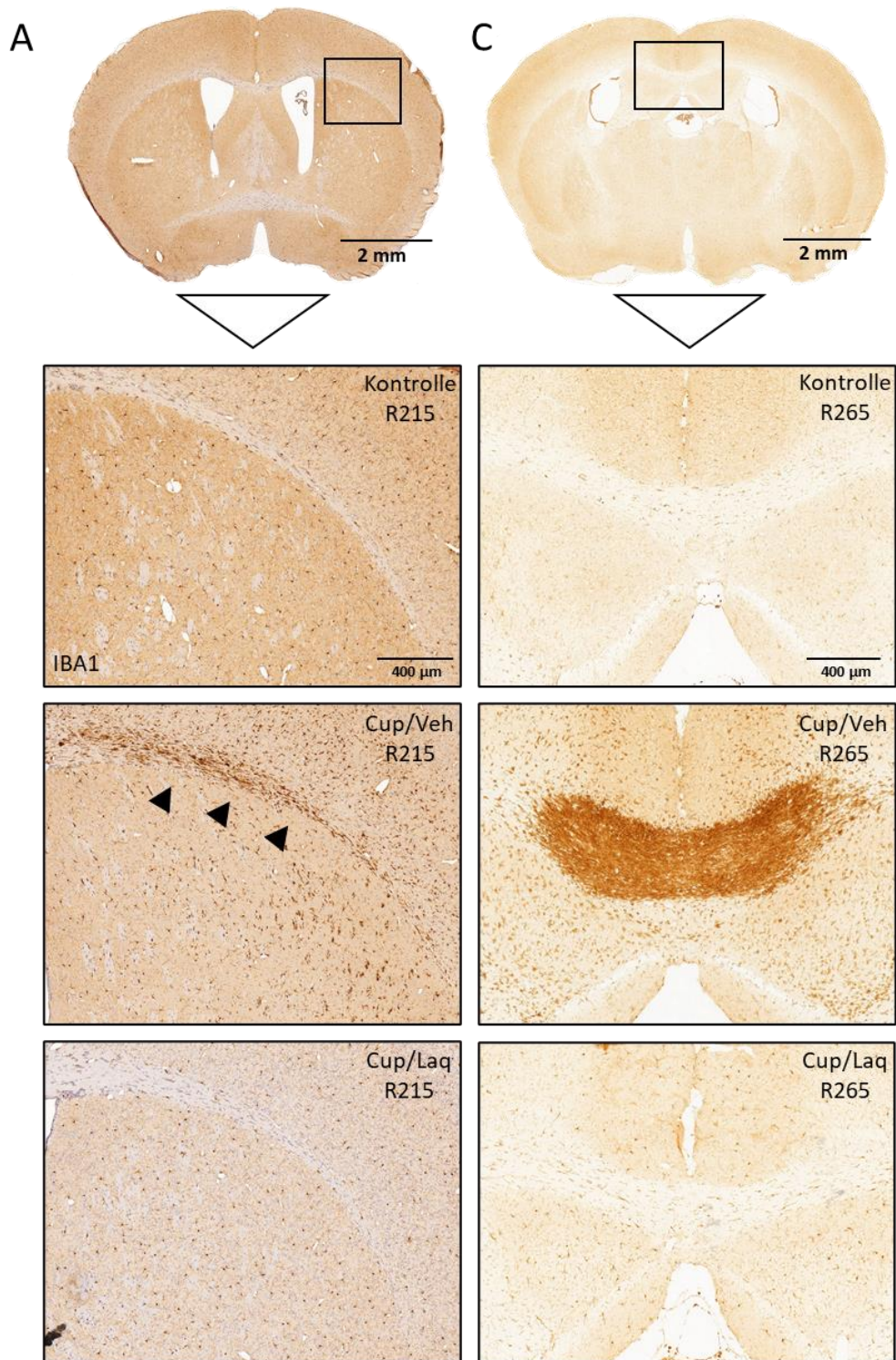


Abb. 23 Immunhistochemischer Nachweis von IBA1 in der Kontroll-, Cup/Veh- und Cup/Laq-Gruppe in Region 215 und Region 265.

A Anti-IBA1 Färbung in repräsentativen Ausschnitten des ICC im Frontalschnitt der Kontroll- [TN456], Cup/Veh- [TN465] und Cup/Laq-Gruppe [TN480], Region 215. Die Pfeilspitzen markieren IBA1⁺-Zellen im ICC der Cup/Veh-Gruppe. **B** Grafische Darstellung der Dichte an IBA1⁺-Zellen [1/mm²] im ICC der drei Versuchsgruppen, Region 215. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mittels Kruskal-Wallis-Test, gefolgt von einem Dunns-Test auf statistische Signifikanz geprüft; ***p = 0,0001 für Ko vs. Cup/Veh und **p = 0,0096 für Cup/Veh vs. Cup/Laq. **C** Anti-IBA1 Färbung in repräsentativen Ausschnitten des mCC im Frontalschnitt der Kontroll- [TN458], Cup/Veh- [TN461] und Cup/Laq-Gruppe [TN467], Region 265. **D** Grafische Darstellung der Dichte an IBA1⁺-Zellen [1/mm²] im mCC der drei Versuchsgruppen, Region 265. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mittels Kruskal-Wallis-Test, gefolgt von einem Dunns-Test auf statistische Signifikanz geprüft; **p = 0,0013 für Ko vs. Cup/Veh und **p = 0,0013 für Cup/Veh vs. Cup/Laq.

3.1.4 Anti-MAC-3 Färbung

Mit der anti-MAC-3 Färbung wurde untersucht, ob Laquinimod die Expression von dem Aktivitätsmarker MAC-3 in Makrophagen und Mikrogliazellen herunter reguliert.

Abb. 24 **A** zeigt den immunhistochemischen Nachweis von MAC-3 im ICC der Region 215 in Kontroll-, Cup/Veh-, und Cup/Laq-Tieren. In Kontrolltieren zeigten sich wenige MAC-3⁺-Zellen sowie eine MAC-3-Zelldichte von $0,30 \pm 0,30$ [1/mm²] im ICC (Abb. 24 **A, B**). In der Cup/Veh-Gruppe zeigte sich ein hyperzelluläres MAC-3⁺-Bild und eine MAC-3-Zelldichte von $417,1 \pm 77,66$ [1/mm²] (Abb. 24 **A, B**). Im Unterschied dazu wurden in Cup/Laq-Tieren nur vereinzelte MAC-3⁺-Zellen quantifiziert und eine MAC-3-Zelldichte von $0,82 \pm 0,55$ [1/mm²] bestimmt (Abb. 24 **A, B**). Abb. 24 **B** zeigt den statischen Unterschied der MAC-3-Zelldichte im ICC auf Höhe der vorderen Kommissur. Im Kruskal-Wallis-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied (****p < 0,0001) zwischen den drei Versuchsgruppen. Laquinimod führte zu einer deutlichen Herunterregulierung von MAC-3 in Makrophagen und Mikrogliazellen.

Tab. 16 Zusammenfassung der anti-MAC-3 Ergebnisse

Angabe als Mittelwert \pm SEM, * Einheit 1/mm² gilt für ICC, R215, # Einheit % gilt für mCC, R265, M: Threshold Moments, Y: Threshold Yen, †Kruskal-Wallis-Test

Versuchsgruppen	Kontrolle	Cup/Veh	Cup/Laq	P
	Mittelwert \pm SEM [1/mm ²] ⁺ [%] [#]	Mittelwert \pm SEM [1/mm ²] ⁺ [%] [#]	Mittelwert \pm SEM [1/mm ²] ⁺ [%] [#]	
ICC, R215	$0,30 \pm 0,30$	$417,10 \pm 77,66$	$0,82 \pm 0,55$	<0,0001 [†]
mCC, R265 M	$15,21 \pm 0,88$	$98,13 \pm 0,41$	$19,11 \pm 0,92$	<0,0001 [†]
mCC, R265 Y	$0,21 \pm 0,02$	$70,54 \pm 4,44$	$0,34 \pm 0,06$	<0,0001 [†]

In Abb. 24 **C, D** wurde der immunhistochemische Nachweis von MAC-3 im Frontalschnitt im mCC der Region 265 der Kontroll-, Cup/Veh- und Cup/Laq-Gruppe dargestellt. Zur Bestimmung der anti-MAC-3 Färbeintensität wurde der Threshold „Yen“ (Abb. 24 **D**, Tab. 16)

und der Threshold „Moments“ (Tab. 16) angewendet. Die weitere Beschreibung der Ergebnisse bezieht sich auf den Threshold „Yen“. In Kontrollschnitten wurden fast keine MAC-3⁺-Zellen im mCC festgestellt und eine anti-MAC-3 Färbeintensität von $0,21 \pm 0,02$ [%] bestimmt (Abb. 24 C, D). In Schnitten der Cup/Veh-Gruppe wurde eine starke anti-MAC-3 Färbeintensität von $70,54 \pm 4,44$ [%] bestimmt (Abb. 24 C, D). In Schnitten der Cup/Laq-Gruppe zeigte sich eine sehr geringe anti-MAC-3 Färbeintensität von $0,34 \pm 0,06$ [%]. Diese war vergleichbar mit der anti-MAC-3 Färbeintensität des mCC der Kontrollgruppe (Abb. 24 C, D). Abb. 24 D stellt die Ergebnisse der MAC-3 Flächenbestimmung [%] grafisch dar. Der Kruskal-Wallis-Test zeigte einen signifikanten Unterschied (****p < 0,0001) zwischen den drei Versuchsgruppen.

Zusammenfassend verhinderte die Laquinimod-Gabe eine durch Cuprizone-induzierte Hochregulierung von MAC-3 in Makrophagen und Mikrogliazellen. Eine reduzierte Mikrogliose durch Laquinimod wurde somit bestätigt. Im nächsten Versuch wurde untersucht, ob diese reduzierte Mikrogliose durch Laquinimod in Form von reduzierter TSPO-Expression in vivo im PET-CT nachweisbar ist.

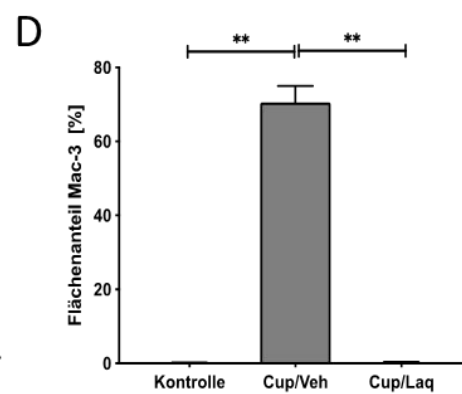
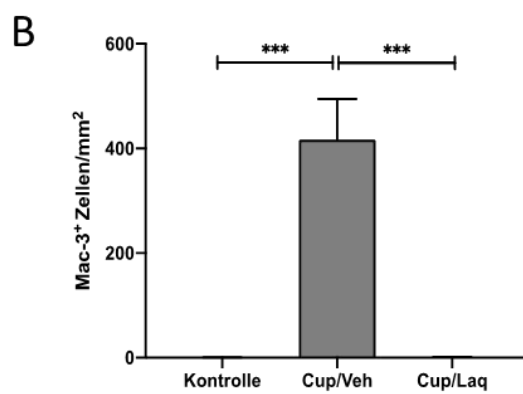
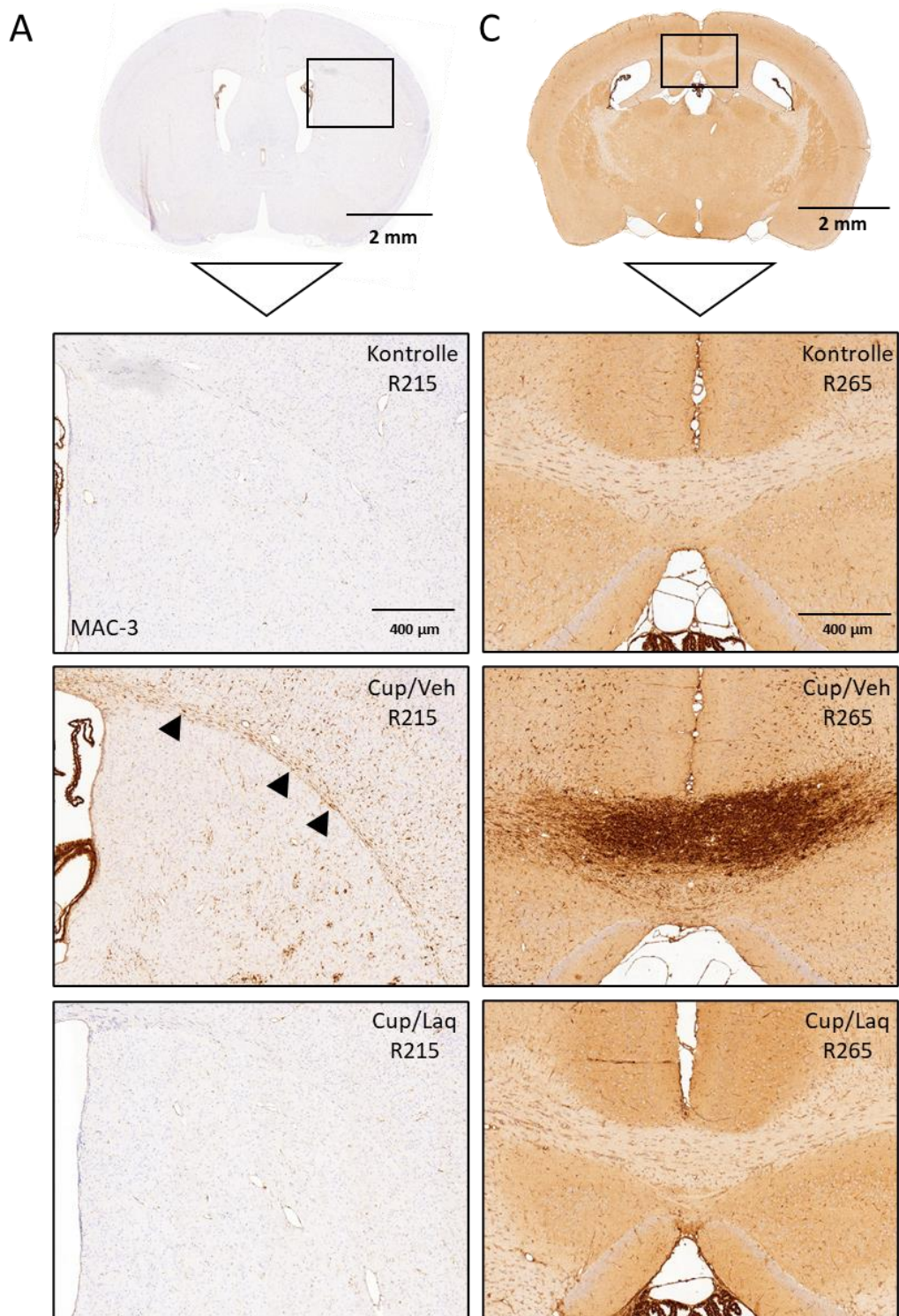


Abb. 24 Immunhistochemischer Nachweis von MAC-3 in der Kontroll-, Cup/Veh- und Cup/Laq-Gruppe in Region 215 und Region 265.

A Anti-MAC-3 Färbung in repräsentativen Ausschnitten des ICC im Frontalschnitt der Kontroll- [TN456], Cup/Veh- [TN472] und Cup/Laq-Gruppe [TN468], Region 215. Die Pfeilspitzen markieren MAC-3⁺-Zellen im ICC der Cup/Veh-Gruppe. **B** Grafische Darstellung der Dichte an MAC-3⁺-Zellen [1/mm²] im ICC der drei Versuchsgruppen, Region 215. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mittels Kruskal-Wallis-Test, gefolgt von einem Dunns-Test auf statistische Signifikanz geprüft; ***p = 0,0003 für Ko vs. Cup/Veh und Cup/Veh vs. Cup/Laq. **C** Anti-MAC-3 Färbung in repräsentativen Ausschnitten des mCC im Frontalschnitt der Kontroll- [TN459], Cup/Veh- [TN465] und Cup/Laq-Gruppe [TN479], Region 265. **D** Grafische Darstellung der Dichte an MAC-3⁺-Zellen [1/mm²] mit dem Threshold Yen im mCC der drei Versuchsgruppen, Region 265. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mittels Kruskal-Wallis-Test, gefolgt von einem Dunns-Test auf statistische Signifikanz geprüft; **p = 0,0013 für Ko vs. Cup/Veh und **p = 0,0011 für Cup/Veh vs. Cup/Laq.

3.1.5 TSPO-Expression Messung im PET-CT

Zur in-vivo Bestimmung der aktivierten Mikrogliazellen und Astrozyten wurde die TSPO-Expression [kBq/cc] im mCC und ICC der Versuchstiere bestimmt. In Abb. 25 **A** sind die gemittelten PET-CT Aufnahmen der Versuchstiere auf koronaren Schnittbildern eines MRI Atlas projiziert. Die obere Reihe zeigt die Höhe der vorderen Kommissur und die untere Reihe die Höhe des rostralen Hippocampus. Es zeigte sich eine deutlich erhöhte Traceraufnahme im mCC und ICC der Cup/Veh-Gruppe, jedoch nicht in der Cup/Laq-Gruppe. Tab. 17 zeigt die Mittelwerte der TSPO-Expression der R215 und R265. Es zeigte sich eine deutlich erhöhte Traceraufnahme in der Cup/Veh-Gruppe; die Traceraufnahme der Kontroll- und Cup/Laq-Gruppe sind vergleichbar niedrig.

Tab. 17 Zusammenfassung der TSPO-Expression

Angabe als Mittelwert \pm SEM, Einheit kBq/cc, [†] Kruskal-Wallis-Test

Versuchsgruppen	Kontrolle	Cup/Veh	Cup/Laq	P
	Mittelwert \pm SEM [kBq/cc]	Mittelwert \pm SEM [kBq/cc]	Mittelwert \pm SEM [kBq/cc]	
TSPO, R215, ICC	141,6 \pm 14,46	274,3 \pm 26,35	164,1 \pm 3,95	0,0066 [†]
TSPO, R265, mCC	193,0 \pm 13,84	332,9 \pm 46,36	233,7 \pm 7,86	0,0242 [†]

Abb. 25 **B** stellt die [18F]-GE-180 Expression im ICC der R215 der Versuchsgruppen grafisch dar. Im Kruskal-Wallis-Test wurde ein signifikanter Unterschied (**p = 0,0066) zwischen den Versuchsgruppen bestimmt. Abb. 25 **C** stellt die [18F]-GE-180 Expression im mCC der R265 der Versuchsgruppen grafisch dar. Die statistische Auswertung zeigte einen signifikanten Unterschied (*p = 0,0242) zwischen den Versuchsgruppen.

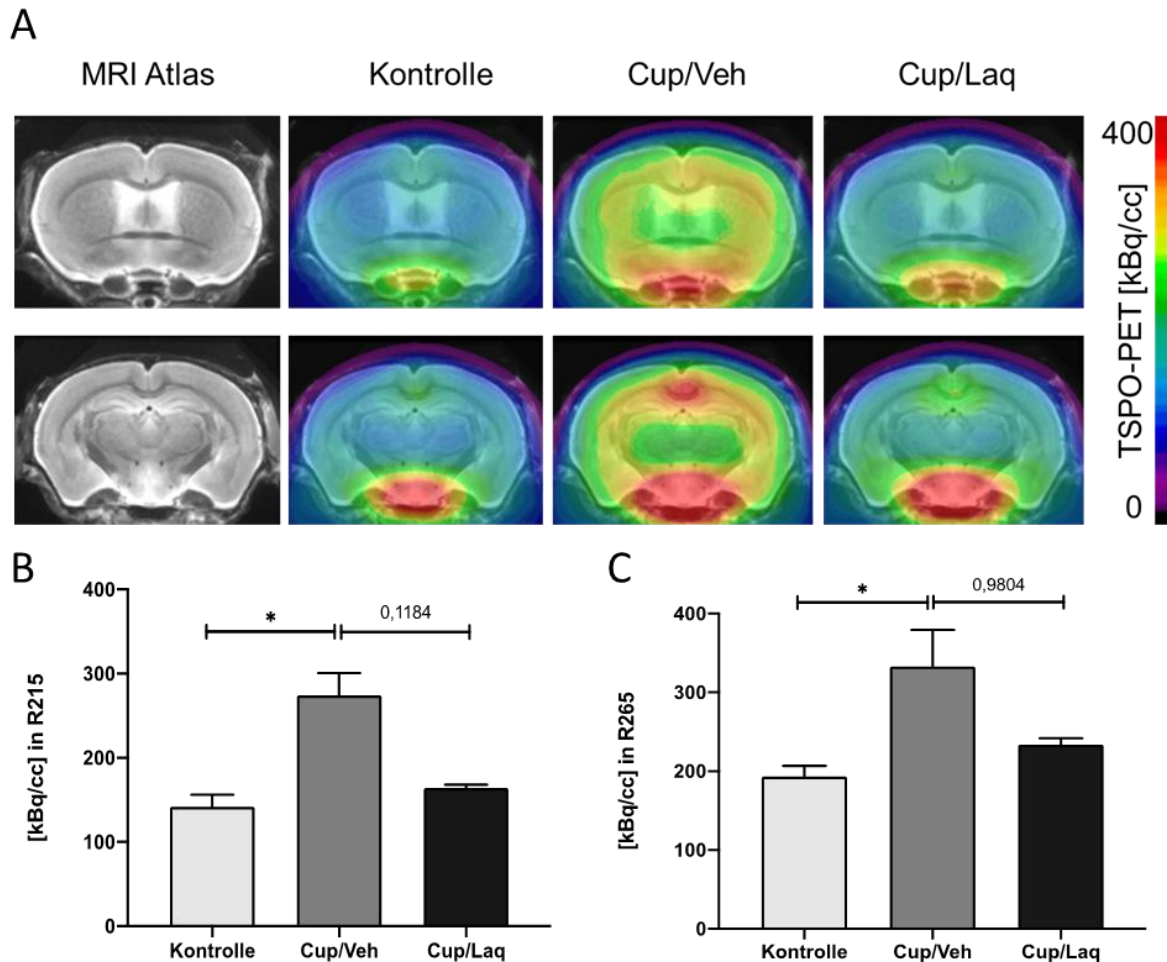


Abb. 25 Expression von [^{18}F]-GE-180 im PET-CT in der Kontroll-, Cup/Veh- und Cup/Laq-Gruppe.

A Koronare PET-CT Aufnahmen der [^{18}F]-GE-180 Expression in der Kontroll-, Cup/Veh- und Cup/Laq-Gruppe. Die obere Reihe zeigt die PET-CT Aufnahmen der Region 215, die untere Reihe zeigt die PET-CT Aufnahmen der Region 265. Die Skala zeigt an welcher Farbton welcher TSPO-Expression in [kBq/cc] entspricht. **B** Grafische Darstellung der TSPO-Expression der drei Versuchsgruppen im ICC der Region 215. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mittels Kruskal-Wallis-Test, gefolgt von einem Dunns-Test auf statistische Signifikanz geprüft; * $p = 0,0243$ für Ko vs. Cup/Veh und $p = 0,1184$, nicht signifikant für Cup/Veh vs. Cup/Laq. **C** Grafische Darstellung der TSPO-Expression der drei Versuchsgruppen im mCC der Region 265. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mittels Kruskal-Wallis-Test, gefolgt von einem Dunns-Test auf statistische Signifikanz geprüft; * $p = 0,0324$ für Ko vs. Cup/Veh und $p = 0,9804$, nicht signifikant für Cup/Veh vs. Cup/Laq.

Zusammenfassend wurde in diesem Versuch eine durch Laquinimod reduzierte Mikrogliose und Astrozytose in-vivo im PET-CT dargestellt. Die Ergebnisse des Kapitels 3.1 zeigen deutlich, dass Laquinimod die Cuprizone-induzierte Myelinpathologie und Mikrogliose reduziert. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob dieser neuroprotektive Effekt auf den Untergang von Oligodendrozyten und die Aktivierung von Mikrogliazellen sekundär zur Reduktion von perivaskulärer Inflammation und Immunzellrekrutierung führt.

3.2 Vergleich der CupEAE/Veh- und CupEAE/Laq-Versuchsgruppe

In diesem Abschnitt der Arbeit wurde untersucht, ob der neuroprotektive Effekt von Laquinimod im Cuprizone-Modell in verminderter sekundärer Rekrutierung von peripheren Immunzellen in das Telencephalon resultiert. Hierfür wiederholten wir den oben beschriebenen Tierversuch und immunisierten Gruppe D und E zu Beginn der sechsten Versuchswoche mit dem MOG₃₅₋₅₅ Peptid. Im ersten Abschnitt werden die klinischen Symptome und der Inflammationsindex des Rückenmarks der Versuchstiere der zwei Gruppen verglichen. Im zweiten Teil werden die PVCs in der CupEAE/Veh- und CupEAE/Laq-Gruppe im Telencephalon mit Hilfe der H.E. Färbung verglichen. Im letzten Teil wird die Einwanderung von peripheren Immunzellen mit dem immunhistochemischen Nachweis von CD4 untersucht.

3.2.1 Vergleich der klinischen Symptome

In diesem Schritt wurde der Symptombeginn der Versuchstiere, der kumulative klinische Score und der maximale klinische Score der CupEAE/Veh- und CupEAE/Laq-Gruppe verglichen (Abb. 26 **A, B, C, D**). Bruck et al. zeigten, dass Laquinimod immunsuppressiv wirkt (Bruck and Wegner, 2011). Wenn die klinischen Symptome der CupEAE/Laq-Gruppe sich deutlich von denen der CupEAE/Veh-Gruppe unterscheiden würden, wäre dies ein Hinweis dafür, dass die immunsuppressive Wirkung von Laquinimod die EAE-Immunisierung gehemmt hat und somit eine reduzierte aktive Immunreaktion in der CupEAE/Laq-Gruppe entstand. In diesem Fall würde eine verminderte Anzahl an PVCs im Vorderhirn durch die gehemmte Immunisierung verursacht worden sein und nicht durch eine verminderte sekundäre Rekrutierung von Immunzellen bei deutlich reduzierter Neurodegeneration. Dieser immunsuppressive Effekt von Laquinimod sollte mit der verzögerten EAE-Immunisierung der Versuchstiere zwei Wochen nach Absetzen des Laquinimods vermieden werden.

In der Abb. 26 wurden die EAE-Scores beider Versuchsgruppen mit jeweils $n = 5$ Versuchstieren dargestellt. In Abb. 26 **A** sind die Mittelwerte der jeweiligen Scores der Versuchsgruppen aufgetragen. In schwarz sind die klinischen Scores der CupEAE/Veh-Gruppe und in rot die Scores der CupEAE/Laq-Gruppe dargestellt. Es zeigte sich eine ähnliche Entwicklung der klinischen Symptome (Abb. 26 **A**). In Abb. 26 **B** ist dargestellt, wann der erste Symptombeginn eines Versuchstiers in der jeweiligen Gruppe war. Es ergab sich ein Wert von $12,2 \pm 0,6633$ Tagen für die CupEAE/Veh-Gruppe und $12,4 \pm 0,6000$ Tagen für die CupEAE/Laq-Gruppe. Die statistische Auswertung zeigte keinen eindeutigen Unterschied ($p = 0,8730$) zwischen den zwei Versuchsgruppen (Abb. 26 **B**, Tab. 18).

Tab. 18 Vergleich der klinischen SymptomeAngabe als Mittelwert \pm SEM, [‡]Mann-Whitney-Test

Versuchsgruppen	CupEAE/Veh Mittelwert \pm SEM	CupEAE/Laq Mittelwert \pm SEM	P
Symptombeginn	12,2 \pm 0,6633	12,4 \pm 0,6000	0,8730 [‡]
Kum. klinischer Score	7,4 \pm 2,6430	6,2 \pm 2,3960	0,5952 [‡]
Max. klinischer Score	2,6 \pm 0,4848	1,9 \pm 0,5339	0,4683 [‡]

Abb. 26 **C** zeigt den kumulativen klinischen Score der Versuchstiere innerhalb einer Gruppe. Der kumulative klinische Score der CupEAE/Veh-Gruppe betrug $7,4 \pm 2,6430$ sowie $6,2 \pm 2,3960$ für die CupEAE/Laq-Gruppe. Im Mann-Whitney-Test zeigte sich keine statistische Signifikanz ($p = 0,5952$) zwischen den zwei Versuchsgruppen (Tab. 18). Der Vergleich des maximalen klinischen Scores innerhalb einer Versuchsgruppe ist in Abb. 26 **D** dargestellt. Dafür wurden die maximalen klinischen Scores der zehn Versuchstiere am Ende des Versuchs gemittelt und gegeneinander aufgetragen. Der maximale Score der CupEAE/Veh-Gruppe lag bei $2,60 \pm 0,4848$ und für die CupEAE/Laq-Gruppe bei $1,90 \pm 0,5339$. Im Mann-Whitney-Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,4683$) zwischen den Versuchsgruppen (Tab. 18).

Zusammenfassend zeigten die statistischen Auswertungen, dass die klinische Symptomatik der Versuchstiere nicht relevant durch Laquinimod beeinflusst wurde. Es zeigte sich, dass die EAE-Immunisierung eine vergleichbare aktive Immunreaktion in der CupEAE/Veh- und CupEAE/Laq-Gruppe hervorrief. Folglich wurde vermutet, dass der immunsuppressive Effekt von Laquinimod so gering war, dass die EAE-Immunisierung in CupEAE/Laq-Versuchstieren nicht gehemmt wurde. Im nächsten Schritt wurde nochmals die potenzielle immunsuppressive Wirkung von Laquinimod untersucht, indem die durch Laquinimod beeinflusste inflammatorische Demyelinisierung im Rückenmark der Versuchstiere betrachtet wurde.

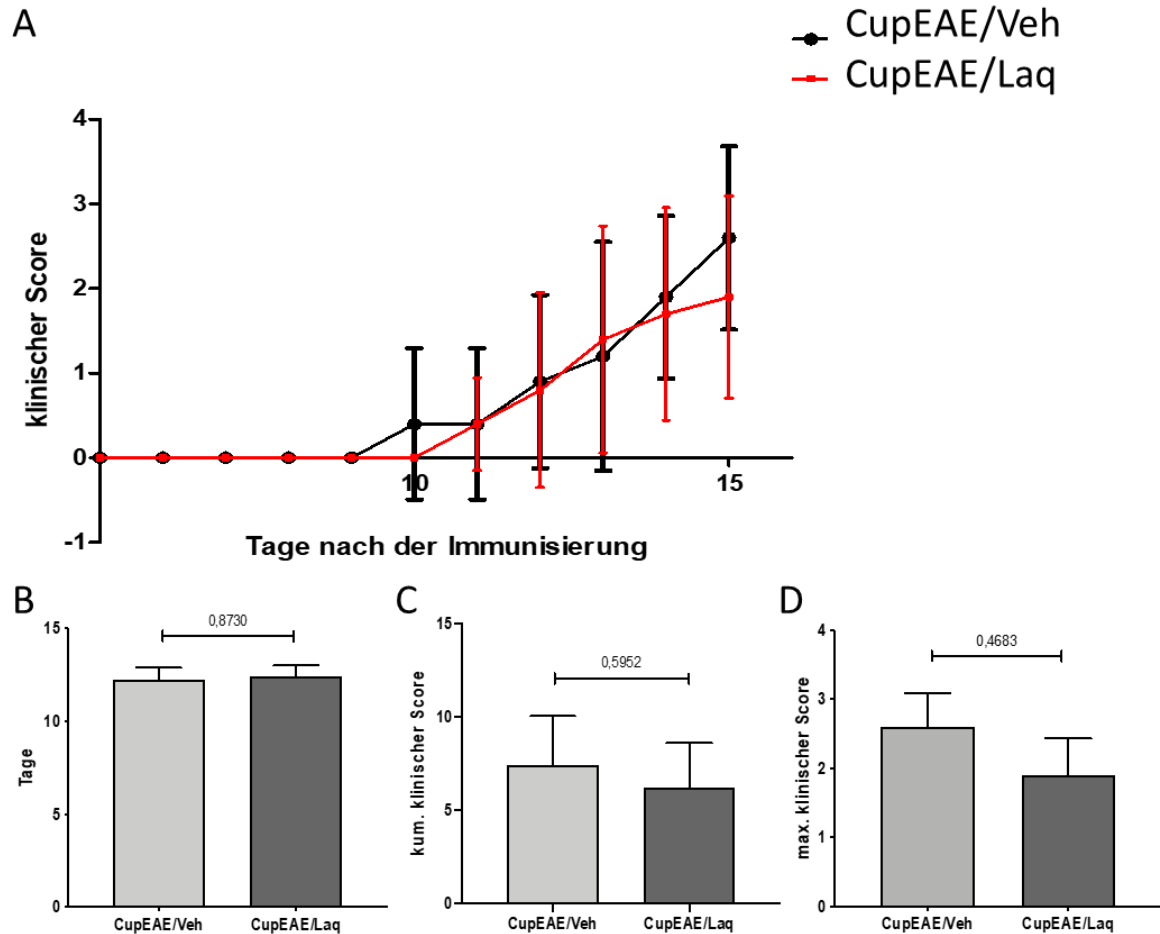


Abb. 26 Vergleich der klinischen Symptome der CupEAE/Veh- und CupEAE/Laq-Gruppe.

A Entwicklung der klinischen Scores der CupEAE/Veh- (schwarz) und CupEAE/Laq-Gruppe (rot). Die Mittelwerte der Versuchstiere ($n = 5$) aus jeder Gruppe sind an den jeweiligen Tagen dargestellt. **B** Grafische Darstellung des ersten Symptombeginns von Versuchstieren jeder Gruppe. Der Unterschied zwischen den zwei Versuchsgruppen wurde mittels Mann-Whitney-Test auf statistische Signifikanz geprüft; $p = 0,8730$ für CupEAE/Veh vs. CupEAE/Laq. **C** Grafische Darstellung des Vergleichs der kumulativen klinischen Scores der Tiere einer Gruppe. Der Unterschied zwischen den zwei Versuchsgruppen wurde mittels Mann-Whitney-Test auf statistische Signifikanz geprüft; $p = 0,5952$ für CupEAE/Veh vs. CupEAE/Laq. **D** Grafische Darstellung des Vergleichs des maximalen klinischen Scores innerhalb der Versuchsgruppen. Der Unterschied zwischen den zwei Versuchsgruppen wurde mittels Mann-Whitney-Test auf statistische Signifikanz geprüft; $p = 0,4683$ für CupEAE/Veh vs. CupEAE/Laq.

3.2.2 Inflammationsindex im Rückenmark

In diesem Schritt wurde untersucht, ob die immunsuppressive Wirkung von Laquinimod die aktive Immunantwort nach EAE-Immunisierung gehemmt hat und somit zu reduzierter inflammatorischer Demyelinisierung im Rückenmark der CupEAE/Laq-Gruppe geführt hat. Aufgrund der vergleichbaren klinischen Symptomentwicklung (Kapitel 3.2.1) vermuteten wir, dass Laquinimod zu keiner deutlichen Reduktion an inflammatorischer Demyelinisierung im Rückenmark der CupEAE/Laq-Gruppe geführt hat. Zur Messung des Inflammationsindex im Rückenmark wurde die Fläche der inflammatorischen Läsionen durch die Fläche der weißen Substanz im Rückenmark geteilt.

In Abb. 27 A ist das Rückenmark eines Versuchstiers der CupEAE/Veh-Gruppe dargestellt. Es zeigten sich vermehrt inflammatorische Läsionen am Rand der weißen Substanz. Abb. 27 B zeigt das Rückenmark eines Versuchstiers der CupEAE/Laq-Gruppe. Hier zeigten sich vereinzelte inflammatorische Läsionen am Rand der weißen Substanz. Der Vergleich des Inflammationsindex der zwei Versuchsgruppen ist in Abb. 27 C grafisch dargestellt. Im Durchschnitt zeigte sich ein Inflammationsindex von $9,13 \pm 2,7990$ [%] für die CupEAE/Veh-Gruppe vs. $3,20 \pm 1,7360$ [%] für die CupEAE/Laq-Gruppe. Im Mann-Whitney-Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,0892$) zwischen den zwei Versuchsgruppen (Tab. 19).

Tab. 19 Inflammationsindex des Rückenmarks

Angabe als Mittelwert \pm SEM, Einheit %, † Mann-Whitney Test

Versuchsgruppen	CupEAE/Veh Mittelwert \pm SEM [%]	CupEAE/Laq Mittelwert \pm SEM [%]	P
Inflammationsindex	$9,13 \pm 2,7990$	$3,20 \pm 1,7360$	$0,0892^{\dagger}$

In Übereinstimmung mit der vergleichbaren aktiven Immunreaktion zwischen der CupEAE/Veh- und CupEAE/Laq-Gruppe (Kapitel 3.2.1) zeigte sich kein signifikanter Unterschied der inflammatorischen Läsionen im Rückenmark der CupEAE/Veh- und CupEAE/Laq-Gruppe. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass Laquinimod in unserem Versuchsaufbau nicht relevant immunsuppressiv gewirkt hat um die Immunreaktion nach EAE-Immunisierung zu hemmen und die Immunreaktion im Rückenmark der Versuchstiere zu reduzieren. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die durch Laquinimod verminderte Cuprizone-induzierte Myelinpathologie und Mikrogliose sekundär zur Reduktion von perivaskulärer Inflammation im Telencephalon führte.

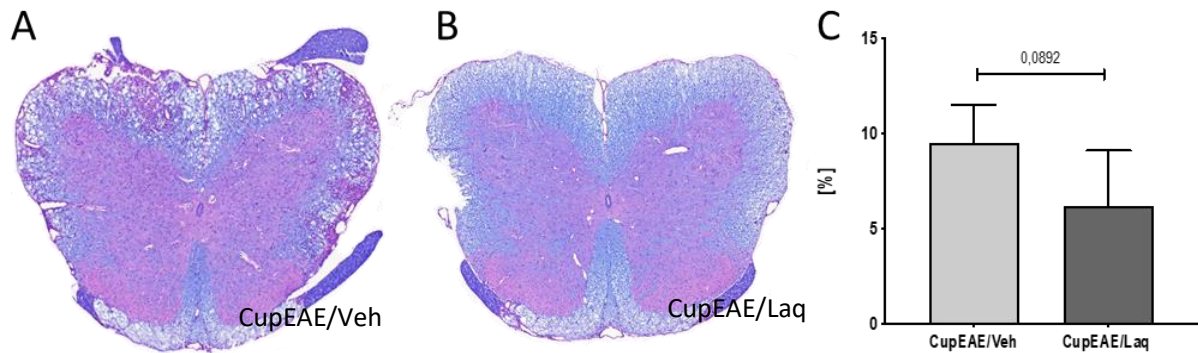


Abb. 27 Inflamationsindex des Rückenmarks der CupEAE/Veh- und CupEAE/Laq-Gruppe.

A LFB/PAS Färbung eines Horizontalschnitts des Rückenmarks der CupEAE/Veh-Gruppe [TN486]. **B** LFB/PAS Färbung eines Horizontalschnitts des Rückenmarks der CupEAE/Laq-Gruppe [TN493]. **C** Vergleich des Inflamationsindex der beiden Gruppen. Der Unterschied zwischen den zwei Versuchsgruppen wurde mittels Mann-Whitney-Test auf statistische Signifikanz geprüft; $p = 0,0892$ für CupEAE/Veh vs. CupEAE/Laq.

3.2.3 H.E. Färbung

In diesem Schritt wurde untersucht, ob der neuroprotektive Effekt von Laquinimod auf Cuprizone-induzierte Oligodendrozytenapoptose und Mikrogliose sekundär zur Reduktion an perivaskulärer Inflammation im Telencephalon der CupEAE/Laq-Gruppe führt. Um die perivaskuläre Inflammation im Telencephalon der CupEAE/Veh- und CupEAE/Laq-Gruppe zu vergleichen, wurden die PVCs der zwei Versuchsgruppen quantifiziert.

In Abb. 28 **A**, **B**, **C** wurde die Region 215 dargestellt. Die Lokalisation eines PVC wurde mit einem schwarzen Punkt gekennzeichnet. Abb. 28 **A** zeigt die Verteilung aller PVCs der CupEAE/Veh-Tiere in einer Grafik vereint ($\text{Anzahl}_{\text{PVC}} = 16$). In Abb. 28 **B** ist die Summe und Verteilung aller PVCs der CupEAE/Laq-Gruppe dargestellt ($\text{Anzahl}_{\text{PVC}} = 1$). Die Mittelwerte der PVCs in CupEAE/Veh- ($3,3 \pm 1,0200$) und CupEAE/Laq-Gruppe ($0,20 \pm 0,2000$) sind in Abb. 28 **C** grafisch dargestellt. Im Mann-Whitney-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($*p = 0,0159$) zwischen den beiden Versuchsgruppen (Tab. 20).

Tab. 20 Zusammenfassung der PVC Quantifizierung

Angabe als Mittelwert \pm SEM, [‡]Mann-Whitney-Test

Versuchsgruppen	CupEAE/Veh Mittelwert \pm SEM	CupEAE/Laq Mittelwert \pm SEM	P
PVC, R215	3,3 \pm 1,0200	0,2 \pm 0,2000	0,0159 [‡]
PVC, R265	3,4 \pm 1,6910	0,4 \pm 0,2449	0,0476 [‡]

In der Abb. 28 **D**, **E**, **F** sind die Ergebnisse der Region 265 dargestellt. Abb. 28 **D** zeigt die Verteilung aller PVCs der CupEAE/Veh-Gruppe in einem H.E. Schnitt summiert ($\text{Anzahl}_{\text{PVC}} = 16$). Die Quantifizierung und Verteilung aller PVCs der CupEAE/Laq-Gruppe ist in Abb. 28 **E** dargestellt ($\text{Anzahl}_{\text{PVC}} = 2$). Die Mittelwerte der PVCs in CupEAE/Veh- ($3,4 \pm 1,6910$) und CupEAE/Laq-Tieren ($0,40 \pm 0,2449$) sind in Abb. 28 **F** dargestellt. Im Mann-Whitney-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied (* $p = 0,0476$) zwischen den zwei Versuchsgruppen (Tab. 20).

Zusammenfassend wurde mit dieser Färbung gezeigt, dass Laquinimod deutlich die sekundäre Immunzellrekrutierung in den perivaskulären Raum im Telencephalon hemmt. In Kombination mit den Ergebnissen von Kapitel 3.2.1 und 3.2.2 zeigte sich, dass diese verminderte Inflammation sehr wahrscheinlich nicht durch den immunsuppressiven Effekt von Laquinimod hervorgerufen wurde, sondern die neuroprotektive Wirkung von Laquinimod auf die Myelinpathologie und Mikroglia zur Reduktion von Immunzellrekrutierung geführt hat. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob Laquinimod die sekundäre Rekrutierung von CD4⁺-Lymphozyten ins Telencephalon hemmt.

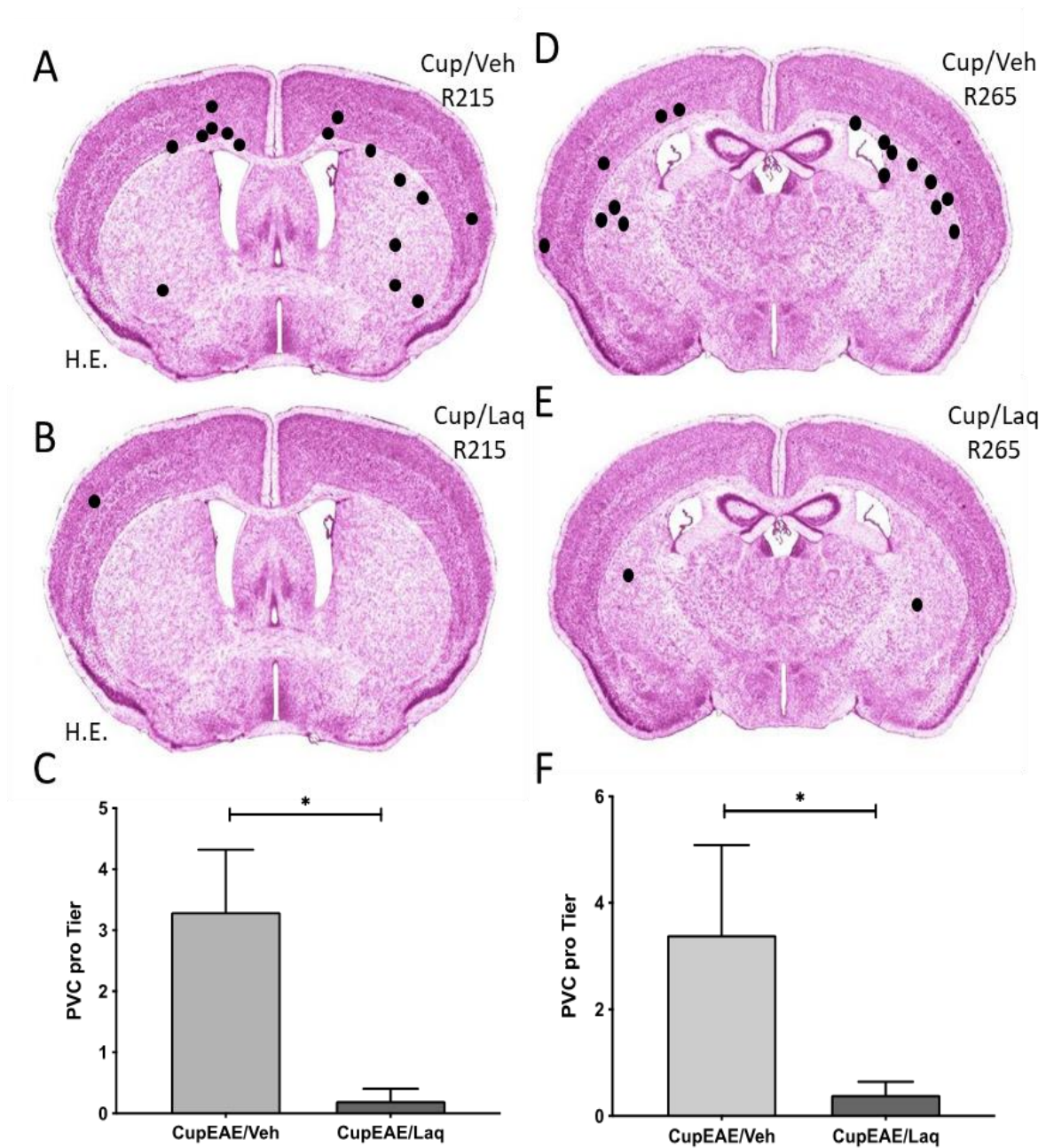


Abb. 28 Vergleich der Anzahl an PVC in der CupEAE/Veh- und CupEAE/Laq-Gruppe in Region 215 und Region 265.

A Verteilung der gesamten PVC der Region 215 der CupEAE/Veh-Gruppe [TN485-489]. Jeder schwarze Punkt markiert ein PVC. **B** Verteilung der gesamten PVC der Region 215 der CupEAE/Laq-Gruppe [TN490-494]. Jeder schwarze Punkt markiert ein PVC. **C** Grafische Darstellung der gemittelten Anzahl an PVC pro Tier beider Versuchsgruppen in Region 215. Der Unterschied zwischen den zwei Versuchsgruppen wurde mittels Mann-Whitney-Test auf statistische Signifikanz geprüft; * $p = 0,0159$ für CupEAE/Veh vs. CupEAE/Laq. **D** Verteilung der gesamten PVC der Region 265 der CupEAE/Veh-Gruppe [TN485-489]. Jeder schwarze Punkt markiert ein PVC. **E** Verteilung der gesamten PVC der Region 265 der CupEAE/Laq-Gruppe [TN490-494]. Jeder schwarze Punkt markiert ein PVC. **F** Grafische Darstellung der gemittelten Anzahl an PVC pro Tier beider Versuchsgruppen in Region 265. Der Unterschied zwischen den zwei Versuchsgruppen wurde mittels Mann-Whitney-Test auf statistische Signifikanz geprüft; * $p = 0,0476$ für CupEAE/Veh vs. CupEAE/Laq.

3.2.4 Anti-CD4 Färbung

Mit der anti-CD4 Färbung wurde untersucht, ob die neuroprotektive Wirkung von Laquinimod auf Myelin und Mikrogliazellen sekundär zu verminderter Rekrutierung von CD4⁺-Lymphozyten ins Telencephalon führt.

In der CupEAE/Veh-Gruppe wurden eindeutige CD4⁺-Zellen im CC, Striatum, Kortex, Subkortex und gehäuft um PVC beobachtet (Abb. 29 **A, C**). In der CupEAE/Laq-Gruppe zeigten sich nur vereinzelt CD4⁺-Zellen im CC, Striatum, Kortex und Subkortex, sowie keine PVC (Abb. 29 **A, C**). In Abb. 29 **B** ist die Dichte der CD4⁺-Zellen im pScx der CupEAE/Veh- ($9,75 \pm 3,6910$ [1/mm²]) und CupEAE/Laq-Gruppe ($1,69 \pm 1,3310$ [1/mm²]) dargestellt. Im Mann-Whitney-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied (*p = 0,0317) zwischen den zwei Versuchsgruppen (Tab. **21**). Die Dichte der CD4⁺-Zellen im mCC der CupEAE/Veh- ($172,6 \pm 23,4400$ [1/mm²]) und CupEAE/Laq-Gruppe ($4,56 \pm 3,7890$ [1/mm²]) ist grafisch in Abb. 29 **D** dargestellt. Im Mann-Whitney-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied (**p = 0,0079) zwischen den zwei Versuchsgruppen (Tab. **21**).

Tab. 21 Quantifizierung der CD4⁺-Lymphozyten

Angabe als Mittelwert \pm SEM, Einheit 1/mm², *Mann-Whitney Test

Versuchsgruppen	CupEAE/Veh Mittelwert \pm SEM [1/mm ²]	CupEAE/Laq Mittelwert \pm SEM [1/mm ²]	P
mCC, R215	172,6 \pm 23,4400	4,56 \pm 3,7890	0,0079 [‡]
pScx, R215	9,75 \pm 3,6910	1,69 \pm 1,3310	0,0317 [‡]
mCC, R265	185,40 \pm 21,5200	10,02 \pm 5,0680	0,0079 [‡]
pScx, R265	18,44 \pm 11,3700	1,11 \pm 1,1120	0,0159 [‡]

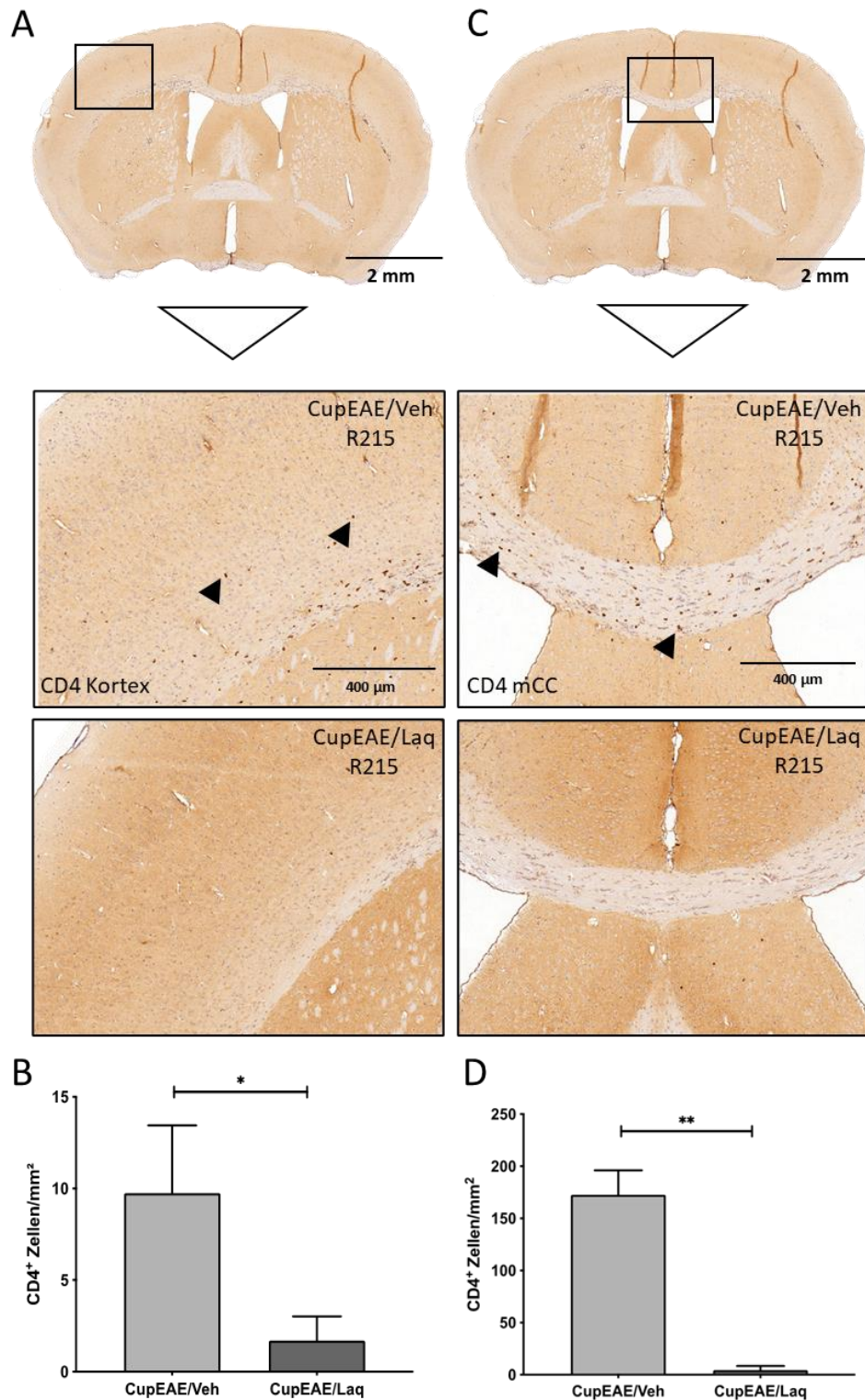


Abb. 29 Sekundäre Rekrutierung von CD4⁺-Lymphozyten ins Telencephalon der CupEAE/Veh- und CupEAE/Laq-Gruppe in Region 215.

A Anti-CD4 Färbung des pScx im Frontalschnitt der CupEAE/Veh- [TN485] und CupEAE/Laq-Gruppe [TN491]. Die Pfeilspitzen markieren CD4⁺-Lymphozyten. **B** Grafische Darstellung der Anzahl an CD4⁺-Zellen/mm² im pScx. Der Unterschied zwischen den zwei Versuchsgruppen wurde mittels Mann-Whitney-Test auf statistische Signifikanz geprüft; *p = 0,0317 für CupEAE/Veh vs. CupEAE/Laq. **C** Anti-CD4 Färbung des mCC im Frontalschnitt der CupEAE/Veh- [TN485] und CupEAE/Laq-Gruppe [TN491]. **D** Grafische Darstellung der Anzahl an CD4⁺-Zellen/mm² im mCC. Der Unterschied zwischen den zwei Versuchsgruppen wurde mittels Mann-Whitney-Test auf statistische Signifikanz geprüft; **p = 0,0079 für CupEAE/Veh vs. CupEAE/Laq.

Die Dichte der CD4⁺-Zellen im mCC und im pScx der CupEAE/Veh- und CupEAE/Laq-Gruppe der Region 265 ist in Abb. 30 **A, B, C, D** dargestellt. Die Grafik in Abb. 30 **B** zeigt die Dichte an CD4⁺-Zellen im pScx der CupEAE/Veh- ($18,44 \pm 11,3700$ [1/mm²]) und CupEAE/Laq-Gruppe ($1,11 \pm 1,1120$ [1/mm²]). Im Mann-Whitney-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied (*p = 0,0159) zwischen den zwei Versuchsgruppen (Tab. **21**). Abb. 30 **D** stellt die Dichte an CD4⁺-Zellen im mCC der CupEAE/Veh- ($185,40 \pm 21,5200$ [1/mm²]) und CupEAE/Laq-Gruppe ($10,02 \pm 5,0680$ [1/mm²]) grafisch dar. Im Mann-Whitney-Test zeigte sich ein deutlicher Unterschied (**p = 0,0079) zwischen den Versuchsgruppen (Tab. **21**).

Dieser Versuch zeigte, dass Laquinimod eindeutig die sekundäre Rekrutierung von CD4⁺-Lymphozyten ins Telencephalon hemmt. Die neuroprotektive Wirkung von Laquinimod auf Myelin und Mikrogliazellen, führte sekundär zu weniger Immunzellrekrutierung. Des Weiteren unterstützen diese Ergebnisse die „Inside-Out-Hypothese“.

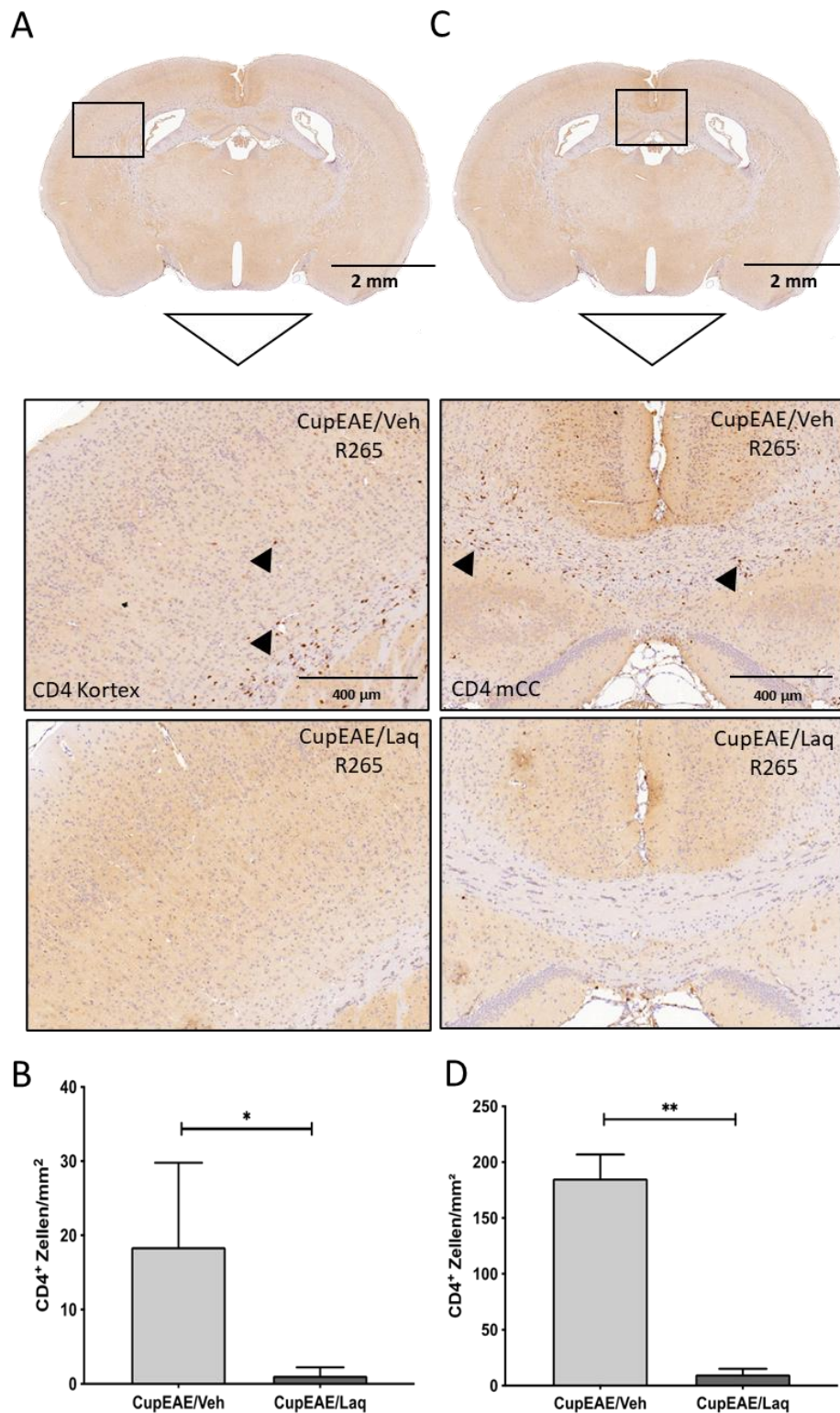


Abb. 30 Sekundäre Rekrutierung von peripheren CD4⁺-Lymphozyten ins Telencephalon der CupEAE/Veh- und CupEAE/Laq-Gruppe in Region 265.

A Anti-CD4 Färbung des pScx im Frontalschnitt der CupEAE/Veh- [TN488] und CupEAE/Laq-Gruppe [TN493]. **B** Grafische Darstellung der Anzahl an CD4⁺-Zellen/mm² im pScx. Die Pfeilspitzen markieren CD4⁺-Lymphozyten. Der Unterschied zwischen den zwei Versuchsgruppen wurde mittels Mann-Whitney-Test auf statistische Signifikanz geprüft; *p = 0,0159 für CupEAE/Veh vs. CupEAE/Laq. **C** Anti-CD4 Färbung des mCC im Frontalschnitt der CupEAE/Veh- [TN488] und CupEAE/Laq-Gruppe [TN493]. **D** Grafische Darstellung der Anzahl an CD4⁺-Zellen/mm² im mCC. Der Unterschied zwischen den zwei Versuchsgruppen wurde mittels Mann-Whitney-Test auf statistische Signifikanz geprüft; **p = 0,0079 für CupEAE/Veh vs. CupEAE/Laq.

4 Diskussion

Im folgenden Kapitel werden zunächst die Ergebnisse dieser Dissertation unter Einbezug der aktuellen Literatur diskutiert und im zweiten Teil die Einschränkungen der Methodik aufgeführt.

4.1 Einfluss der Laquinimod-Behandlung auf Neurodegeneration und Inflammation

Unsere Arbeitsgruppe und andere Forschungsgruppen zeigten, dass primäre Oligodendrozytendegeneration periphere Immunzellen ins Telencephalon von MOG-immunisierten Mäusen triggern kann (Scheld et al., 2016, Baxi et al., 2015, Ruther et al., 2017). In diesem Versuch sollte nun untersucht werden, ob eine durch Laquinimod reduzierte Oligodendrozytendegeneration sekundär zu weniger Immunzellrekrutierung führt.

4.1.1 Myelinisierung

Der Pathomechanismus, der zum Cuprizone-induzierten Untergang von Oligodendrozyten und somit zu Demyelinisierung führt, ist nicht vollständig verstanden (Venturini, 1973). Es wird vermutet, dass Cuprizone kupferabhängige Enzyme in Mitochondrien inhibiert, ein Ungleichgewicht im Energiemetabolismus entsteht und es somit zur Apoptose von Oligodendrozyten kommt (Torkildsen et al., 2008, Kipp et al., 2009).

Vorherige Untersuchungen zeigten, dass Laquinimod einen neuroprotektiven Effekt auf Oligodendrozyten hat. Eine durch Cuprizone-verursachte toxische Demyelinisierung konnte mit der Laquinimod-Behandlung vermindert werden (Bruck et al., 2012, Kramann et al., 2016). Diese Ergebnisse wurden in dieser Dissertation bestätigt. Es zeigte sich, dass Laquinimod die Demyelinisierung fast vollständig inhibiert und der Myelinisierungsgrad der Cup/Laq-Gruppe vergleichbar mit der Kontrollgruppe ist. Der Myelinisierungsgrad wurde im nächsten Schritt mit einer Färbung gegen das Myelinprotein PLP nochmals bestimmt. Auch hier zeigte sich, dass eine durch Cuprizone-induzierte metabolische Zerstörung von Oligodendrozyten durch Laquinimod verhindert werden konnte.

Kramann et al. und Bruck et al. vermuten, dass der neuroprotektive Effekt von Laquinimod im Cuprizone-Modell durch eine reduzierte Aktivierung des NF- κ B Signalwegs in Astrozyten

hervorgerufen wird. In aktiven MS Läsionen kommt es zur Aktivierung des NF- κ B Signalwegs in Oligodendrozyten, Astrozyten, Mikrogliazellen und einwandernden Makrophagen (Bonetti et al., 1999). Die Aktivierung des NF- κ B Signalwegs spielt auch beim Cuprizone-induzierten Untergang von Oligodendrozyten eine große Rolle (Raasch et al., 2011). Eine Laquinimod-Behandlung von isolierten Mauseastrozyten *in vitro* führte zu einer nicht Toll-like-Rezeptor abhängigen, reduzierten Aktivierung des NF- κ B Signalwegs (Bruck et al., 2012, Kramann et al., 2016). Durch die Reduktion des astrozytären NF- κ B-Signalwegs zeigte sich eine geringere Cuprizone-induzierte Demyelinisierung in Mäusen mit Laquinimod-Behandlung. Die durch Laquinimod verursachte Regulierung der astrozytären, pro-inflammatorischen Signalwege könnte ein Grund für die protektiven Effekte von Laquinimod auf Myelin und Axone sein (Bruck et al., 2012). Bis heute gibt es keinen Therapieansatz gegen den Untergang von Oligodendrozyten bzw. für den Erhalt von Oligodendrozyten und der dazugehörigen Myelinscheide. Die Mehrzahl der medikamentösen MS Therapien wirken auf die autoimmune Komponente von MS und sind deshalb im Cuprizone-Modell nicht wirksam (Yakimov et al., 2019). Kramann et al., Bruck et al. und unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass Laquinimod einen anti-inflammatorischen Effekt auf gehirnintrinsische Vorgänge hat und somit eine neue Therapiemöglichkeit zur Aufrechterhaltung von Oligodendrozyten darstellen könnte.

4.1.2 Mikrogliaaktivierung

Die Funktion von Mikrogliazellen im ZNS wird kontrovers diskutiert. Nimmerjahn et al. zeigten, dass Mikrogliazellen auch im ruhenden Zustand stetig eine Überwachung ihrer Mikroumgebung durchführen und somit für ein physiologisch gesundes ZNS wesentlich sind (Nimmerjahn et al., 2005). Weiter konnte gezeigt werden, dass Mikrogliazellen im aktivierten Zustand durch die Expressionsinduktion von Proteasen, Zytokinen und freien Radikalen toxisch auf Neurone wirken (Glass et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine Laquinimod-Behandlung zu deutlich reduzierter Mikrogliaaktivierung im CC führt und somit ein potenziell neuroprotektiver Effekt entsteht. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit Studien von Bruck et al., Kramann et al., Mishra et al. und Kaye et al. (Bruck et al., 2012, Kramann et al., 2016, Mishra et al., 2014, Kaye et al., 2016). Mishra et al. zeigte weiter, dass das Ausmaß der Mikrogliaaktivierung in Zellkulturen von der Laquinimoddosis abhängt. Je höher die Dosierung von Laquinimod auf die Mikrogliazellen, desto weniger Mikrogliaaktivierung wurde beobachtet. Die Produktion von Zytokin TNF- α nach Aktivierung von menschlichen oder Maus-Mikrogliazellen mit

Lipopolysaccharid wurde durch Laquinimod signifikant abgeschwächt (Mishra et al., 2014). Zusammenfassend führte eine Laquinimod-Behandlung zu einer Umwandlung von pro-inflammatorischen Mikrogliazellen (M1) in anti-inflammatorische Mikrogliazellen (M2) (De Kleijn and Martens, 2020).

Im nächsten Schritt konnte mittels einer linearen Regressionsanalyse gezeigt werden, dass eine positive Relation zwischen dem Myelinisierungsgrad und der Mikrogliaaktivierung besteht. Schnitte aus der Cup/Veh-Gruppe, die mit einem hohen Score (LFB) gestaged wurden, korrelierten mit einer hohen Dichte an Mikrogliaaktivierung (IBA1). Daraus resultierte primär eine neuroprotektive Wirkung von Laquinimod auf das Myelin und die Mikrogliazellen. Eine geringere Demyelinisierung könnte in diesem Fall die verringerte Mikrogliaaktivierung provozieren oder eine reduzierte Mikrogliaaktivierung zu einem höheren Myelinisierungsgrad führen.

Durch die Färbung gegen MAC-3 konnte bestätigt werden, dass es sich bei den Mikrogliazellen um aktivierte Zellen handelt. In der Cup/Laq-Gruppe konnte die Aktivierung von Mikrogliazellen durch die Laquinimod-Behandlung minimiert werden. Bruck et al. veröffentlichte ebenfalls eine eindeutig reduzierte aktivierte Mikrogliazelldichte zwischen der Cup/Laq- und Cup/Veh-Gruppe (Bruck et al., 2012).

4.1.3 TSPO-Expression im PET-CT

Der neuroprotektive Effekt von Laquinimod konnte zusätzlich in vivo mit der Bestimmung des TSPO Tracers [¹⁸F]-GE-180 im PET-CT dargestellt werden. Welche ZNS Zelltypen in MS Patienten TSPO exprimieren, ist noch unklar. Präklinische Studien zeigten, dass TSPO von Mikrogliazellen exprimiert wird und folglich eine Erhöhung der TSPO-Expression einer Mikrogliaaktivierung entspricht (Abourbeh et al., 2012, Mattner et al., 2013). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass es im Cuprizone-Modell zu einer erhöhten Expression von TSPO in Mikrogliazellen und zusätzlich in Astrozyten kommt (Nack et al., 2019). Die Laquinimod-Behandlung konnte die Expression von TSPO und damit die Aktivierung von Mikrogliazellen und/oder Astrozyten in vivo signifikant vermindern. Eine erhöhte Expression von TSPO kennzeichnet zwar pro-inflammatorische Zelltypen, jedoch ist diese pro-inflammatorische Umgebung nicht immer mit einer Neurodegeneration assoziiert (Beckers et al., 2018).

4.1.4 Klinische Symptome und Inflammationsindex im Rückenmark

Im nächsten Schritt zeigte sich, dass der kumulative klinische Score, der Krankheitsbeginn, der maximale klinische Score und der Inflammationsindex im Rückenmark der Versuchstiere nicht wesentlich durch Laquinimod modifiziert wurden. Laquinimod könnte durch seinen immunsuppressiven Effekt zu einer abgeschwächten EAE-Immunisierung führen. Wäre dies der Fall, würde die eindeutig reduzierte Immunzellrekrutierung ins Telencephalon (Kapitel 3.2.4) durch die unterdrückte EAE-Immunisierung hervorgerufen werden. Dieser immunsuppressive Effekt von Laquinimod auf die EAE-Immunisierung sollte jedoch durch den Versuchsaufbau reduziert werden. Durch die Beendigung der Laquinimod-Behandlung zwei Wochen vor der EAE-Induktion wurde vermutet, dass die Laquinimoddosis im Körper gering genug war, um nicht immunsuppressiv auf die EAE-Immunisierung zu wirken. Des Weiteren zeigte Brunmark et al., dass Laquinimod die Anzahl an T- und B-Zellen in Milzgewebe von immunisierten Mäusen erhöht und folglich im Gegensatz zu Dexamethason nicht allgemein immunsuppressiv, sondern immunmodulatorisch wirkt (Brunmark et al., 2002).

Die Ergebnisse der klinischen Symptome und des Inflammationsindex im Rückenmark in der CupEAE/Veh- und CupEAE/Laq-Gruppe erscheinen zuerst widersprüchlich im Vergleich zu vorherigen Studien (Yang et al., 2004, Thone et al., 2012, Aharoni et al., 2012). In dieser Studie sollte jedoch durch die verzögerte Induktion der EAE zwei Wochen nach Ende der Laquinimod-Gabe die immunsuppressive Wirkung von Laquinimod verhindert werden. Comi et al. zeigten, dass eine sehr hohe Dosis von Laquinimod verabreicht werden muss, um die volle immunsuppressive Wirkung zu erreichen (Comi et al., 2008). Eine Studie von Brunmark et al. untersuchte die Pharmakokinetik von Laquinimod in weiblichen SJL/N Mäusen. Bei einer Dosierung von 5 mg/kg zeigte sich eine maximale Plasmakonzentration von 26 µmol/l. Nach 20 h wurde eine Plasmakonzentration von < 1 µmol/l gemessen, woraus eine geringe Halbwertszeit von Laquinimod resultiert (Brunmark et al., 2002, Bruck and Wegner, 2011). Diese pharmakokinetischen Ergebnisse lassen sich jedoch nicht direkt auf das vorliegende Experiment übertragen, da in dieser Arbeit eine höhere Laquinimod Dosis (25 mg/kg) verwendet wurde. Wie Abb. 26 C zeigt, ist der kumulative klinische Score der CupEAE/Laq-Gruppe geringer im Vergleich zur CupEAE/Veh-Gruppe; statistische Signifikanz ($p = 0,5952$) wurde jedoch nicht erreicht. Es könnten zu wenige Versuchstiere in den Versuch eingeschlossen worden sein, um festzustellen, ob Laquinimod die anti-MOG Immunantwort unterdrückt.

Zusammenfassend kann ein geringer immunsuppressiver Effekt von Laquinimod nicht ausgeschlossen werden. Allerdings würde ein potenziell geringer immunsuppressiver Effekt

von Laquinimod nicht die eindeutig reduzierte Immunzellrekrutierung ins Telencephalon und somit neuroprotektive Wirkung von Laquinimod im Telencephalon erklären (Nedelcu et al., 2019).

4.1.5 Perivaskuläre Inflammation und Rekrutierung von Immunzellen

Im letzten Teil unseres Versuchs wurde eine deutliche Reduktion an PVCs im Telencephalon und signifikante Hemmung von sekundärer CD4⁺-Immunzellrekrutierung durch eine Laquinimod-Behandlung im Cup/EAE-Versuch gezeigt. Aufgrund der vergleichbar aktiven Immunreaktion (Kapitel 3.2.1 und Kapitel 3.2.2) in der CupEAE/Veh- und CupEAE/Laq-Gruppe nach EAE-Immunisierung, wird von einem minimalen immunsuppressiven Effekt von Laquinimod ausgegangen, welcher nicht zur Unterdrückung der EAE-Immunisierung geführt hat. Unsere Arbeitsgruppe vermutet, dass die verminderte Immunzellrekrutierung (Kapitel 3.2.4) nicht durch die Hemmung der EAE-Immunisierung, sondern sekundär durch eine reduzierte Triggerung von Immunzellen aufgrund der Neuroprotektion durch Laquinimod hervorgerufen wurde. Somit zeigte sich, dass die durch Laquinimod verursachte Neuroprotektion im Cuprizone-Modell sekundär zu weniger perivaskulären Infiltraten und reduzierter Immunzellrekrutierung ins Telencephalon von MOG-immunisierten Mäusen führte. Dieses Ergebnis stützt die „Inside-Out-Hypothese“ und zeigt einen direkten Zusammenhang zwischen Neurodegeneration und Inflammation im MS Pathomechanismus.

In akuten und chronischen EAE Versuchen zeigte sich eine deutlich reduzierte Inflammation durch Laquinimod (Brunmark et al., 2002, Wegner et al., 2010, Jolivel et al., 2013, Schulze-Topphoff et al., 2012, Kaye et al., 2016, Moore et al., 2013). In akuten EAE Versuchen führte eine Laquinimod-Behandlung nach MOG Induktion zu einer Aufhebung des klinischen Scores von bis zu 91,4 % sowie zu einer signifikanten Reduktion an eingewanderten CD4⁺-, CD8⁺- und CD45⁺-Immunzellen ins ZNS. In chronischen EAE Stadien (klinischer Score > 4) konnte die Laquinimod-Behandlung eine Verschlimmerung der EAE Symptomatik verhindern (Brunmark et al., 2002, Jolivel et al., 2013, Varrin-Doyer et al., 2016).

Schulze-Topphoff et al. zeigten weiter, dass eine Laquinimod-Behandlung die Bildung von Typ II Monozyten und Typ II dendritischen Zellen fördert, welche eine proinflammatorische T-Zell Immunantwort unterdrücken können (Schulze-Topphoff et al., 2012). Gurevich et al. veröffentlichten eine detaillierte Genanalyse über den Einfluss von Laquinimod auf dendritische Zellen in MS Patienten und zeigten eine Herunterregulierung von MHC Klasse-II Antigen präsentierenden Genen durch Laquinimod (Gurevich et al., 2010). Jolivel et al. zeigte

eine verminderte Chemokinproduktion von menschlichen dendritischen Zellen mit Laquinimod-Behandlung. Die Inhibierung des NF- κ B Weges könnte für die veränderte Reifung von dendritischen Zellen verantwortlich sein (Jolivel et al., 2013). Toubi et al. zeigten eine durch Laquinimod verursachte Hochregulierung von CD25⁺-B-Zellen in in-vitro Zellkulturen von MS-Patienten (Toubi et al., 2012). Regulatorische B-Zellen können eine Hemmung von CD4⁺-T-Zellproliferation induzieren (Kessel et al., 2012). Dies könnte einen Teil des immunmodulatorischen Mechanismus von Laquinimod darstellen.

Weitere Studien untersuchten den Mechanismus der antiinflammatorischen Wirkung von Laquinimod und zeigten, dass eine Laquinimod-Behandlung zur Reduktion von Th1- und Th17-proinflammatorischen Immunantworten, zur Herunterregulierung von „very late antigen 4“ (VLA 4) Integrinen und zur Verschiebung der Zytokinausschüttung zu Gunsten von Th2/Th3 Interleukinen IL-4, IL-10 und TGF- β führt. Diese anti-inflammatorischen Mechanismen könnten der Grund für die verminderte Migration von Immunzellen ins ZNS sein (Zou et al., 2002, Brunmark et al., 2002, Yang et al., 2004, Wegner et al., 2010, Aharoni et al., 2012, Jolivel et al., 2013).

Eine Studie von Thone et al. zeigte, dass in Blutproben von MS Patienten mit Laquinimod-Behandlung eine vermehrte Produktion von „brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF) stattfindet (Thone et al., 2012). Die gleiche Arbeitsgruppe beobachtete, dass es bei Mäusen mit fehlendem BDNF zu erhöhtem axonalen Schaden und stärkeren klinischen Symptomen bei chronischer EAE kommt. Weiter führte die Injektion von T-Zellen mit hoher BDNF-Expression zu einer mildereren EAE Symptomatik und direkter Schonung von Axonen (Linker et al., 2010). Aharoni et al. zeigten eine signifikant erhöhte Expression von BDNF in Laquinimod-behandelten Mäusen im chronischen EAE Stadium. Die Expression von BDNF wurde im chronischen EAE Stadium deutlich (20 % - 50 %) reduziert. In Laquinimod-behandelten Mäusen entsprach die BDNF-Expression der von Kontrolltieren (Aharoni et al., 2012).

Für die Entwicklung von Therapiestrategien ist es höchst relevant, den Zusammenhang zwischen Neurodegeneration und Inflammation zu verstehen. Frischer et al. zeigten, dass während progressiver MS Stadien T- und B-Zellen im ZNS Parenchym zu finden sind und die Dichte dieser T- und B-Zellen mit dem Ausmaß an demyelinisierenden Läsionen und axonalem Schaden korreliert (Frischer et al., 2009). Wenn Inflammation zu Neurodegeneration („Outside-In-Hypothese“) führt, ist eine antiinflammatorische Therapie die beste Wahl, um das Fortschreiten von Hirnläsionen zu verlangsamen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch das Gegenteil: eine Reduktion an gehirnintrinsischen neurodegenerativen Vorgängen führte sekundär zu verminderter Inflammation im ZNS („Inside-Out-Hypothese“).

4.1.6 Remyelinisierung

Remyelinisierung ist ein komplexer biologischer Vorgang, der Axone vor Neurodegeneration schützt (Franklin and Kotter, 2008, Verden and Macklin, 2016). Frühe neuropathologische Studien zeigten, dass Remyelinisierung in unterschiedlichem Ausmaß nach vorangegangener Demyelinisierung in MS Patienten stattfindet (Rodriguez and Scheithauer, 1994). Durch die Untersuchung von Autopsien konnte Remyelinisierung in jedem Alter und während jedem Krankheitsstadium von MS gezeigt werden (Chang et al., 2012). Es ist jedoch noch nicht verstanden, warum bei manchen Patienten Remyelinisierung stattfindet und bei anderen ausbleibt. In der Studie unserer Arbeitsgruppe wurde das Remyelinisierungspotenzial von Laquinimod untersucht. Es zeigte sich eine signifikant stärkere anti-PLP und anti-MAG Färbeintensität im Vergleich zur Cup/Veh-Gruppe. Diese Studie zeigte, dass Laquinimod einen positiven Effekt auf Cuprizone-induzierte Demyelinisierung hat, Remyelinisierung fördert und sich positiv auf die Differenzierung von Oligodendrozyten Progenitor Zellen auswirkt (Nyamoya et al., 2019).

4.1.7 Klinische Studien von Laquinimod

Es zeigte sich, dass die klassischen immunmodulatorischen Medikamente in PPMS nicht wirkungsvoll sind, da Autoimmunität eine geringere Rolle spielt (Hawker et al., 2009, Lublin et al., 2016). Auch wenn in den Phase III Studien in RRMS nicht alle primären Endpunkte erreicht wurden, könnten die immunologischen Effekte von Laquinimod in Patienten mit PPMS wirksam sein. Im Einklang mit den Studien von Kramann et al., Bruck et al., Thone et al. und Ziemssen et al. (Ziemssen et al., 2017) zeigte unsere Studie, dass Laquinimod einen neuroprotektiven Effekt auf gehirnintrinsische Vorgänge hat und folglich ähnlich wie Siponimod (Kappos et al., 2018) einen therapeutischen Nutzen für Patienten mit PPMS und SPMS haben könnte (Bruck et al., 2012, Thone et al., 2012, Kramann et al., 2016, Nedelcu et al., 2019).

In der ALLEGRO und BRAVO Studie zeigte sich, dass der Effekt von Laquinimod auf die Progression der Erkrankung im Vergleich zu anderen DMTs größer ist als Phase II Studien erwarten ließen (Comi et al., 2012, Vollmer et al., 2014, Polman et al., 2005, Comi et al., 2008). Unsere Arbeitsgruppe vermutet, dass dieser neuroprotektive Effekt von Laquinimod (Reduktion der Gehirnatrophie) sekundär zu der reduzierten Inflammation führte. Im Gegensatz dazu wurde in der Phase II Studie ARPEGGIO, die als erste Studie den Effekt von Laquinimod auf PPMS untersuchte, der primäre Endpunkt, die Minimierung der

Gehirnatrophie, nicht erreicht. Es wurde jedoch eine 60-prozentige Reduktion an T2-gewichteten neuen fokalen Läsionen bestimmt (Giovannoni et al., 2020).

In der CONCERTO Studie konnte kein signifikanter Unterschied in Bezug auf das Fortschreiten der Behinderung nach drei Monaten zwischen der Laquinimod- und Placebogruppe gezeigt werden. Damit verfehlte die Studie Ihren primären Endpunkt. Andererseits zeigte die Studie, dass eine Laquinimod-Therapie den Verlust von Gehirnvolumen und die Schubrate signifikant reduziert (G. Comi, 2017). Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse, unzureichender Effektivität sowie möglicher teratogener und maligner Nebenwirkungen wurde Laquinimod 2014 nicht von dem „Committee for Medicinal Products for Human Use“ (CHMP) zugelassen (Biernacki et al., 2020). In präklinischen Studien gibt es jedoch eindeutige Hinweise auf den neuroprotektiven Effekt von Laquinimod. Dies könnte eine weitere Forschung an Laquinimod rechtfertigen (Ruffini et al., 2013, Varrin-Doyer et al., 2014, Thone and Linker, 2016).

4.2 Methodik

4.2.1 Einschränkung der MS Forschung und Ihrer Tiermodelle

Aufgrund der etablierten Diagnosekriterien (Thompson et al., 2018) und maximaler Invasivität werden bei MS Patienten selten Hirnbiopsien der Läsionen durchgeführt. In wenigen Fällen werden Biopsien entnommen, um Differentialdiagnosen wie andere demyelinisierende Erkrankungen, Tumore, Vaskulitiden oder virale Infektionen auszuschließen. Trotz jahrelanger Forschung ist es noch nicht gelungen, einen diagnostischen Test oder einen verlässlichen Biomarker für MS zu entwickeln (Disanto et al., 2010). Folglich kommt es häufig zu Fehldiagnosen (Solomon et al., 2016). Aufgrund der geringen Stichproben an MS Gewebe stehen der MS Forschung nur wenige, unvollständige Biopsien zur Grundlagenforschung zur Verfügung (Kuhlmann et al., 2008). Des Weiteren hat die MS Forschung aufgrund von strengen Vorschriften nur eingeschränkten Zugang zu den wenigen MS Biopsien. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit zur Verwendung von präklinischen Modellen zur Erforschung der grundlegenden Pathomechanismen von MS.

Dafür stehen in der MS Forschung in-vitro Verfahren, wie tierische oder menschliche Zellkulturen aus Embryonen oder Autopsien sowie in-vivo Verfahren, wie (1) autoimmun, (2) viral oder (3) toxisch induzierte demyelinisierende Tiermodelle zur Verfügung (Naik and Cucullo, 2012, van der Star et al., 2012, Kipp et al., 2012a).

Aufgrund der Heterogenität von MS ist es nicht möglich, alle ätiologischen, genetischen, klinischen und radiologischen Merkmale in einem Tiermodell zu vereinen (Steinman and Zamvil, 2006, Denic et al., 2011, Procaccini et al., 2015). In Tiermodellen wird die Demyelinisierung über einen Zeitraum von drei bis sechs Wochen induziert. Im Gegensatz dazu sind die Ursachen, die in MS zu Demyelinisierung und Neurodegeneration führen, viel komplexer (Oksenberg and Barcellos, 2005, Handel et al., 2010, Westerlind et al., 2014). Im Tiermodell treten die klinischen Symptome meist Tage bis Wochen nach Induktion der Erkrankung auf. Bei MS Erkrankten können die ersten ZNS Pathologien Jahre vor dem ersten Symptom auftreten (Procaccini et al., 2015). Daraus resultierend kann durch ein Tiermodell nur ein kleiner Teilaspekt dieser heterogenen Erkrankung untersucht werden und die Wahl des Tiermodells ist direkt von der Forschungsfrage abhängig.

(1) Die EAE wurde vor über 70 Jahren entdeckt und ist bis heute das am weitesten verbreitete Tiermodell in der MS Forschung. Durch vielversprechende Ergebnisse in EAE Experimenten konnten drei immunmodulatorische Medikamente, (i) Glatirameracetat, (ii) Mitoxantron und (iii) Natalizumab in klinischen MS Studien getestet werden und bilden heute drei der wichtigsten Therapien für MS Patienten (Steinman and Zamvil, 2006). Außerdem führte die EAE dazu, dass der inflammatorische Aspekt der Erkrankung besser verstanden wurde. Für die Verwendung von EAE spricht, dass spezifische Antikörper gegen MOG, wie sie im EAE Modell gebildet werden, auch in MS Gewebe vorkommen (Raine et al., 1999). Andererseits gibt es Substanzen, die in EAE Experimenten zu widersprechenden Ergebnissen geführt haben, jedoch in klinischen MS Studien keinen Effekt oder sogar negative Auswirkungen auf die Patienten hatten (Sriram and Steiner, 2005). Beispielsweise führte „altered peptide ligands“ (APL) in EAE Versuchen zur Reduktion von Krankheitsschüben und Rückbildung von Paralysen (Brocke et al., 1996). In klinischen Studien zeigte sich jedoch, dass die Anwendung zu lebensgefährlichen anaphylaktischen Reaktionen führen kann (Pedotti et al., 2001).

(2) Für die Verwendung von Tiermodellen mit viraler Komponente gibt es zwei wesentliche Gründe. Erstens zeigten frühe epidemiologische Studien, dass eine genetische Prädisposition und eine virale Infektion im Kindesalter zu einer autoimmunen Reaktion gegen ZNS Gewebe führen kann (Dal Canto and Lipton, 1977, Poser, 1986). Zweitens kommt es im viralen Tiermodell, wie auch vermutlich im MS Pathomechanismus, zu einer autoimmunen Reaktion gegen ZNS Gewebe, die viral getriggert wird (Handel et al., 2010). Das am häufigsten verwendete virale Modell ist das Theiler-Murin-Enzephalomyelitis-Virus (TMEV) (Theiler, 1934). Nelson et al. verglichen die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus EAE und TMEV Studien auf klinische MS Studien. Es zeigte sich, dass in Bezug auf das Ansprechen der Therapie die

Ergebnisse der TMEV Experimente häufiger auf die klinischen MS Studien übertragen werden konnten (Nelson et al., 2004, Denic et al., 2011). Andererseits kann TMEV nur in Mäusen aber nicht im Menschen eine autoimmune Demyelinisierung hervorrufen. Also stellt sich die Frage, ob ein nicht humanpathogenes Modell zur Forschung einer humanen Erkrankung genutzt werden sollte (Procaccini et al., 2015)?

(3) Die toxisch induzierte Demyelinisierung im Cuprizone- und Lysophosphatidylcholin (LPC)-Modell entsteht durch eine Degeneration von Oligodendrozyten anstatt durch einen direkten Angriff auf die Myelinscheide. In diesen Tiermodellen können die gehirnintrinsischen Vorgänge ohne autoimmunen Einfluss untersucht werden (Blakemore and Franklin, 2008, Skripuletz et al., 2008). Für die Verwendung dieser Tiermodelle spricht, dass es in manchen MS Läsionen, wie in diesen Tiermodellen, zu primärer nicht autoimmunvermittelter Apoptose von Oligodendrozyten kommt. Lucchinetti et al. untersuchten die Gehirnläsionen von über 50 MS Biopsien und publizierten eine detaillierte histologische Klassifikation. In Läsionstyp III und IV zeigte sich eine primäre Oligodendrozytenapoptose, die vermutlich Toxin vermittelt oder viral ausgelöst wird. Lucchinetti et al. zeigten weiter, dass Typ III Läsionen am häufigsten in frühen MS Läsionen, etwa zwei Monate nach Krankheitsbeginn, zu finden sind (Lucchinetti et al., 2000). Torkildsen et al. beschrieben die Ähnlichkeit der histopathologischen Neurodegeneration im Cuprizone-Modell und in Typ III Läsionen (Torkildsen et al., 2008). Die biochemischen Prozesse, die zum Untergang von Oligodendrozyten im Cuprizone-Modell bzw. in MS Läsionen führen, sind jedoch noch nicht vollständig verstanden. Folglich lässt sich nicht beurteilen, ob der gleiche Pathomechanismus im Tiermodell und in MS Patienten zu Oligodendrozytenapoptose führt (Kipp et al., 2009).

Um die gehirnintrinsische Degeneration und den autoimmunen Aspekt in einem Tiermodell zu vereinen, hat unsere Arbeitsgruppe das CupEAE-Modell entwickelt. Mit der Kombination dieser zwei etablierten Methoden zeigte unsere Arbeitsgruppe einen direkten Einfluss von Neurodegeneration auf das Ausmaß der Immunzelleinwanderung ins ZNS (Scheld et al., 2016, Nedelcu et al., 2019).

Zusammenfassend gibt es bis heute trotz der genannten Einschränkungen keine vergleichbare Alternative zu Tiermodellen und die MS Forschung wird weiterhin von der Verwendung von Tiermodellen profitieren. Selbst wenn kein Tiermodell die verschiedenen Verläufe von MS imitieren kann, führen Tiermodelle zu einem besseren Verständnis der MS Pathogenese und ermöglichen die Erforschung von Therapiemöglichkeiten.

4.2.2 Der Versuchsaufbau

Im vorliegenden Versuch wurde eine Cuprizone-Intoxikation von drei Wochen angewendet, diese kann nicht eine jahrelange MS Erkrankung widerspiegeln. Im Versuch wurden kleine Kollektive an Versuchstieren ($n = 10$) gewählt. Um eine gezieltere Aussage über die Wirkung von Laquinimod zu treffen, muss das Medikament an größeren Fallzahlen getestet werden. Jedoch zeigten sich in unseren Versuchsgruppen homogene Ergebnisse, die auf eine größere Fallzahl übertragen werden könnten. Ein weiterer Störfaktor des Versuchs könnte die genetische Homogenität der Versuchstiere sein. Die Versuchstiere entstanden durch Inzuchtlinien, somit wurde unser Medikament nur an einem bestimmten Genpool getestet. Für diesen Genpool zeigte Laquinimod einen neuroprotektiven Effekt. Es stellt sich die Frage, ob der Effekt dieser homogenen Versuchsgruppe auf die heterogenen MS Patienten übertragen werden kann.

4.2.3 Die Versuchsdurchführung

Des Weiteren gibt es Fehlerquellen in der Versuchsdurchführung, die zu verfälschten Ergebnissen geführt haben könnten. Beispielsweise ist die Menge an Cuprizone, das von den Versuchstieren zu sich genommen wurde, variabel. Dadurch entstehen unterschiedlich starke Demyelinisierungen im ZNS. Weiter könnte das Scoring der Krankheitssymptome zu Ungenauigkeit geführt haben. Die einzelnen Scores liegen sehr nah beieinander und durch die subjektive Einschätzung könnten die Scores falsch zugeordnet worden sein. Durch das Scoring von zwei Beobachtern und die Bildung des Mittelwertes lässt sich diese Fehlerquelle reduzieren (Nedelcu et al., 2019). In unserem Versuch handelte es sich nicht um eine doppelblinde Studie. Da die Versuchsleiter wussten, welchen Versuchstieren Laquinimod oder Vehikel verabreicht wurde, können wir eine Verzerrung der Versuchsergebnisse nicht ausschließen. Die Bias kann jedoch nur während der Behandlung der Versuchstiere zu einer Verfälschung geführt haben, da nach der Euthanasie der Versuchstiere eine Verblindung der Gewebeschnitte stattgefunden hat.

4.2.4 Die Auswertungsverfahren

Die Ergebnisse der LFB/PAS und anti-IBA1 Färbung könnten aufgrund von subjektiven Auswertungsverfahren Ungenauigkeiten aufweisen (Vgl. Abb. 11, Abb. 12, Abb. 14 **D, E, F**). Abb. 20 **B** zeigt, dass alle Schnitte der Cup/Laq-Gruppe als stärker myelinisiert eingeteilt

wurden als die Kontrollschnitte. Dies spricht für den neuroprotektiven Effekt von Laquinimod. Abb. 23 **D** zeigt, dass bei der Beurteilung der Hirnschnitte der anit-IBA1 Färbung kein Unterschied zwischen der Kontroll- und der Cup/Laq-Gruppe resultierte. Im Gegensatz dazu wurden alle Schnitte aus der Cup/Veh-Gruppe visuell erkannt und mit einem Score zwischen 2 und 4 bewertet (Cup/Veh $2,82 \pm 0,23$ vs. Cup/Laq $1,00 \pm 0,00$, **** $p < 0,0001$). Zur Reduktion der Subjektivität wurden die Daten verblindet und die Auswertung von zwei Untersuchern durchgeführt. Dabei wurden vergleichbare Ergebnisse erhoben (Nedelcu et al., 2019).

5 Zusammenfassung

Hintergrund: Grundlegend für den Aufbau dieses Versuchs ist die „Inside-Out-Hypothese“. Diese beschreibt die Pathogenese von MS als einen primär neurodegenerativen Prozess, welcher sekundär zu Immunzellrekrutierung ins Telencephalon führt. In dieser Dissertation wurde die Wirkung von Laquinimod als potenzielle Therapie der MS getestet sowie der direkte Einfluss von abgeschwächter Neurodegeneration auf sekundäre Immunzellrekrutierung in einem neuartigen präklinischen Tiermodell untersucht.

Arbeitshypothese: Der neuroprotektive Effekt von Laquinimod auf den Untergang von Oligodendrozyten und die Aktivierung von Mikrogliazellen führt sekundär zur Reduktion von perivaskulärer Inflammation, Immunzellrekrutierung und Fortschreiten der Hirnläsionen im CupEAE-Modell.

Methoden: C57BL/6J Mäuse wurden mit Cuprizone intoxikiert, um Demyelinisierung und Mikrogliose im Telencephalon auszulösen. Zur Reduktion der Neurodegeneration wurde die Hälfte der Versuchstiere während der Cuprizone-Intoxikation mit Laquinimod (25 mg/kg) behandelt (Gruppe B, C). Im zweiten Teil des Versuchs wurde die Bildung von enzephalitogener T-Zellen aus peripheren lymphatischen Organen durch die Immunisierung der Mäuse mit MOG₃₅₋₅₅ induziert (Gruppe D, E). Die Gehirne der Versuchstiere wurden histologisch aufgearbeitet und verglichen.

Ergebnisse: Unsere Studie zeigte im ersten Schritt, dass Laquinimod als Immunmodulator eine neuroprotektive Wirkung auf Demyelinisierung und Mikrogliose hat. Diese Neuroprotektion führte sekundär zu deutlich verminderter Rekrutierung von peripheren Immunzellen ins Telencephalon.

Schlussfolgerung: Zusammenfassend zeigte unsere Studie einen direkten Zusammenhang von verminderter neuro-intrinsischer Degeneration und reduzierter peripherer Immunzellrekrutierung, welcher die „Inside-Out-Hypothese“ stützt. Unsere Studie verdeutlicht den potenziellen Nutzen von neuroprotektiven Medikamenten und könnte die Entwicklung von Therapien, welche die gehirnintrinsische Entzündung (Mikroglia- und Astrozytenaktivierung) und Degeneration (Oligodendrozytenapoptose) reduzieren, fördern. Diese neuroprotektive Wirkung von Laquinimod könnte das Fortschreiten des neurologischen Defizits und die körperliche Behinderung von MS Patienten verlangsamen.

III. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	„Multiple Sclerosis International Federation – Atlas of MS – 3 rd Edition (September 2020).“ Mit Erlaubnis der Multiple Sclerosis International Federation (Federation, 2020)....	8
Abb. 2	Hypothesen über den Entstehungsmechanismus von MS; „Outside-In-Hypothese“ vs. „Inside-Out-Hypothese“. Abbildung modifiziert nach Stys et al. 2012.	10
Abb. 3	Klinische Verlaufsformen von MS. Abbildung modifiziert nach Lublin et al. 1996. ..	13
Abb. 4	Strukturformel von Laquinimod (Brunmark et al., 2002).....	15
Abb. 5	Versuchsaufbau	25
Abb. 6	Chemische Formel von Cuprizone (Pubchem, 2005).	26
Abb. 7	Sidman Mouse Brain Atlas, R215 (Sidman, 1971).	33
Abb. 8	Sidman Mouse Brain Atlas, Region 265 (Sidman, 1971).	34
Abb. 9	Schematische Darstellung der ABC Methode.	35
Abb. 10	Untersuchte ROIs im Cuprizone- und Cup/EAE-Modell.	42
Abb. 11	Schematische Darstellung der Staging-Methode der LFB/PAS Färbung, Region 215.	43
Abb. 12	Immunhistochemischer Nachweis von LFB/PAS, Region 265.	43
Abb. 13	PLP Auswertung, Region 265.....	44
Abb. 14	Bestimmung der Mikrogliazelldichte in Anti-IBA1 Färbungen.....	45
Abb. 15	Bestimmung der Mikrogliazelldichte in Anti-MAC-3 Färbungen, Region 215 und Region 265.....	46
Abb. 16	Bestimmung des inflammatorischen Index im Rückenmark [TN487].....	48
Abb. 17	Auswertung der PVCs.	49
Abb. 18	Quantifizierung der CD4 ⁺ -Zellen, Region 215.....	50
Abb. 19	Immunhistochemischer Nachweis von LFB/PAS in der Kontroll-, Cup/Veh- und Cup/Laq-Gruppe in R215.....	54
Abb. 20	Immunhistochemischer Nachweis von LFB/PAS in der Kontroll-, Cup/Veh- und Cup/Laq-Gruppe in R265.....	56
Abb. 21	Immunhistochemischer Nachweis von PLP im mCC der Kontroll-, Cup/Veh- und Cup/Laq-Gruppe in Region 265.....	58
Abb. 22	Lineare Regression zwischen der Demyelinisierung (LFB/PAS) und der Mikrogliaaktivierung (IBA1) in der Region 215.	60
Abb. 23	Immunhistochemischer Nachweis von IBA1 in der Kontroll-, Cup/Veh- und Cup/Laq-Gruppe in Region 215 und Region 265.	62
Abb. 24	Immunhistochemischer Nachweis von MAC-3 in der Kontroll-, Cup/Veh- und Cup/Laq-Gruppe in Region 215 und Region 265.	65
Abb. 25	Expression von [¹⁸ F]-GE-180 im PET-CT in der Kontroll-, Cup/Veh- und Cup/Laq-Gruppe.....	66
Abb. 26	Vergleich der klinischen Symptome der CupEAE/Veh- und CupEAE/Laq-Gruppe...	69
Abb. 27	Inflamationsindex des Rückenmarks der CupEAE/Veh- und CupEAE/Laq-Gruppe.	71

Abb. 28 Vergleich der Anzahl an PVC in der CupEAE/Veh- und CupEAE/Laq-Gruppe in Region 215 und Region 265.	73
Abb. 29 Sekundäre Rekrutierung von CD4 ⁺ -Lymphozyten ins Telencephalon der CupEAE/Veh- und CupEAE/Laq-Gruppe in Region 215.....	75
Abb. 30 Sekundäre Rekrutierung von peripheren CD4 ⁺ -Lymphozyten ins Telencephalon der CupEAE/Veh- und CupEAE/Laq-Gruppe in Region 265.....	77

IV. Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Verwendete Materialien für den Tierversuch.....	21
Tab. 2 Verwendete Materialien für die Gewebegewinnung	22
Tab. 3 Verwendete Materialien für die Immunhistochemische Färbungen	23
Tab. 4 EAE-Scoring	30
Tab. 5 Paraffineinbettung	32
Tab. 6 Absteigende Alkoholreihe	36
Tab. 7 Verwendete Primärantikörper	36
Tab. 8 Verwendete Sekundärantikörper.....	37
Tab. 9 Aufsteigende Alkoholreihe.....	37
Tab. 10 H.E. Färbeprotokoll	38
Tab. 11 Entparaffinierung Luxol Fast Blue/PAS Färbung	39
Tab. 12 Aufsteigende Alkoholreihe der LFB/PAS Färbung.....	40
Tab. 13 Zusammenfassung der Staging Ergebnisse der LFB/PAS Färbung, Region 215	55
Tab. 14 Zusammenfassung der Dichtebestimmung im mCC der anti-PLP Färbung, Region 265	57
Tab. 15 Zusammenfassung der Ergebnisse der anti-IBA1 Auswertung.....	59
Tab. 16 Zusammenfassung der anti-MAC-3 Ergebnisse	62
Tab. 17 Zusammenfassung der TSPO-Expression	65
Tab. 18 Vergleich der klinischen Symptome.....	68
Tab. 19 Inflammationsindex des Rückenmarks	70
Tab. 20 Zusammenfassung der PVC Quantifizierung.....	72
Tab. 21 Quantifizierung der CD4 ⁺ -Lymphozyten	74

V. Literaturverzeichnis

- ABOURBEH, G., THEZE, B., MAROY, R., DUBOIS, A., BRULON, V., FONTYN, Y., DOLLE, F., TAVITIAN, B. & BOISGARD, R. 2012. Imaging microglial/macrophage activation in spinal cords of experimental autoimmune encephalomyelitis rats by positron emission tomography using the mitochondrial 18 kDa translocator protein radioligand [(1)(8)F]DPA-714. *J Neurosci*, 32, 5728-36.
- ADELMAN, G., RANE, S. G. & VILLA, K. F. 2013. The cost burden of multiple sclerosis in the United States: a systematic review of the literature. *J Med Econ*, 16, 639-47.
- AGOSTA, F., ROVARIS, M., PAGANI, E., SORMANI, M. P., COMI, G. & FILIPPI, M. 2006. Magnetization transfer MRI metrics predict the accumulation of disability 8 years later in patients with multiple sclerosis. *Brain*, 129, 2620-7.
- AHARONI, R., SAADA, R., EILAM, R., HAYARDENY, L., SELA, M. & ARNON, R. 2012. Oral treatment with laquinimod augments regulatory T-cells and brain-derived neurotrophic factor expression and reduces injury in the CNS of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 251, 14-24.
- ALLEN, I. V. & MCKEOWN, S. R. 1979. A histological, histochemical and biochemical study of the macroscopically normal white matter in multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, 41, 81-91.
- ALTER, M., HALPERN, L., KURLAND, L. T., BORNSTEIN, B., LEIBOWITZ, U. & SILBERSTEIN, J. 1962. Multiple sclerosis in Israel. Prevalence among immigrants and native inhabitants. *Arch Neurol*, 7, 253-63.
- BARKHOF, F. & VAN WALDERVEEN, M. 1999. Characterization of tissue damage in multiple sclerosis by nuclear magnetic resonance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 354, 1675-86.
- BARNETT, M. H. & PRINEAS, J. W. 2004. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol*, 55, 458-68.
- BARTHELMES, J., TAFFERNER, N., KURZ, J., DE BRUIN, N., PARNHAM, M. J., GEISLINGER, G. & SCHIFFMANN, S. 2016. Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice and Evaluation of the Disease-dependent Distribution of Immune Cells in Various Tissues. *J Vis Exp*.
- BAUER, J., RAUSCHKA, H. & LASSMANN, H. 2001. Inflammation in the nervous system: the human perspective. *Glia*, 36, 235-43.
- BAXI, E. G., DEBRUIN, J., TOSI, D. M., GRISHKAN, I. V., SMITH, M. D., KIRBY, L. A., STRASBURGER, H. J., FAIRCHILD, A. N., CALABRESI, P. A. & GOCKE, A. R. 2015. Transfer of myelin-reactive th17 cells impairs endogenous remyelination in the central nervous system of cuprizone-fed mice. *J Neurosci*, 35, 8626-39.
- BAXTER, A. G. 2007. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol*, 7, 904-12.
- BECKERS, L., ORY, D., GERIC, I., DECLERCQ, L., KOOLE, M., KASSIOU, M., BORMANS, G. & BAES, M. 2018. Increased Expression of Translocator Protein (TSPO) Marks Pro-inflammatory Microglia but Does Not Predict Neurodegeneration. *Mol Imaging Biol*, 20, 94-102.
- BENN, T., HALFPENNY, C. & SCOLDING, N. 2001. Glial cells as targets for cytotoxic immune mediators. *Glia*, 36, 200-11.

- BIERNACKI, T., SANDI, D., BENCSIK, K. & VECSEI, L. 2020. Kynurenines in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis: Therapeutic Perspectives. *Cells*, 9.
- BLAKEMORE, W. F. & FRANKLIN, R. J. 2008. Remyelination in experimental models of toxin-induced demyelination. *Curr Top Microbiol Immunol*, 318, 193-212.
- BO, L., MORK, S., KONG, P. A., NYLAND, H., PARDO, C. A. & TRAPP, B. D. 1994. Detection of MHC class II-antigens on macrophages and microglia, but not on astrocytes and endothelia in active multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol*, 51, 135-46.
- BO, L., VEDELER, C. A., NYLAND, H., TRAPP, B. D. & MORK, S. J. 2003. Intracortical multiple sclerosis lesions are not associated with increased lymphocyte infiltration. *Mult Scler*, 9, 323-31.
- BONETTI, B., STEGAGNO, C., CANNELLA, B., RIZZUTO, N., MORETTO, G. & RAINE, C. S. 1999. Activation of NF-kappaB and c-jun transcription factors in multiple sclerosis lesions. Implications for oligodendrocyte pathology. *Am J Pathol*, 155, 1433-8.
- BOSTER, A., NICHOLAS, J., WU, N., YEH, W. S., FAY, M., EDWARDS, M., HUANG, M. Y. & LEE, A. 2017. Comparative Effectiveness Research of Disease-Modifying Therapies for the Management of Multiple Sclerosis: Analysis of a Large Health Insurance Claims Database. *Neurol Ther*, 6, 91-102.
- BRENDEL, M., PROBST, F., JAWORSKA, A., OVERHOFF, F., KORZHOVA, V., ALBERT, N. L., BECK, R., LINDNER, S., GILDEHAUS, F. J., BAUMANN, K., BARTENSTEIN, P., KLEINBERGER, G., HAASS, C., HERMS, J. & ROMINGER, A. 2016. Glial Activation and Glucose Metabolism in a Transgenic Amyloid Mouse Model: A Triple-Tracer PET Study. *J Nucl Med*, 57, 954-60.
- BROCKE, S., GIJBELS, K., ALLEGRETTO, M., FERBER, I., PIERCY, C., BLANKENSTEIN, T., MARTIN, R., UTZ, U., KARIN, N., MITCHELL, D., VEROMAA, T., WAISMAN, A., GAUR, A., CONLON, P., LING, N., FAIRCHILD, P. J., WRAITH, D. C., O'GARRA, A., FATHMAN, C. G. & STEINMAN, L. 1996. Treatment of experimental encephalomyelitis with a peptide analogue of myelin basic protein. *Nature*, 379, 343-6.
- BROWNE, P., CHANDRARATNA, D., ANGOOD, C., TREMLETT, H., BAKER, C., TAYLOR, B. V. & THOMPSON, A. J. 2014. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology*, 83, 1022-4.
- BRUCK, W., GOLD, R., LUND, B. T., OREJA-GUEVARA, C., PRAT, A., SPENCER, C. M., STEINMAN, L., TINTORE, M., VOLLMER, T. L., WEBER, M. S., WEINER, L. P., ZIEMSEN, T. & ZAMVIL, S. S. 2013. Therapeutic decisions in multiple sclerosis: moving beyond efficacy. *JAMA Neurol*, 70, 1315-24.
- BRUCK, W., PFORTNER, R., PHAM, T., ZHANG, J., HAYARDENY, L., PIRYATINSKY, V., HANISCH, U. K., REGEN, T., VAN ROSSUM, D., BRAKELMANN, L., HAGEMEIERS, K., KUHLMANN, T., STADELMANN, C., JOHN, G. R., KRAMANN, N. & WEGNER, C. 2012. Reduced astrocytic NF-kappaB activation by laquinimod protects from cuprizone-induced demyelination. *Acta Neuropathol*, 124, 411-24.
- BRUCK, W. & WEGNER, C. 2011. Insight into the mechanism of laquinimod action. *J Neurol Sci*, 306, 173-9.
- BRUNMARK, C., RUNSTROM, A., OHLSSON, L., SPARRE, B., BRODIN, T., ASTROM, M. & HEDLUND, G. 2002. The new orally active immunoregulator laquinimod (ABR-215062) effectively inhibits development and relapses of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 130, 163-72.

- CARLTON, W. W. 1967. Studies on the induction of hydrocephalus and spongy degeneration by cuprizone feeding and attempts to antidote the toxicity. *Life Sci*, 6, 11-9.
- CHANG, A., STAUGAITIS, S. M., DUTTA, R., BATT, C. E., EASLEY, K. E., CHOMYK, A. M., YONG, V. W., FOX, R. J., KIDD, G. J. & TRAPP, B. D. 2012. Cortical remyelination: a new target for repair therapies in multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 72, 918-26.
- CHRZANOWSKI, U., BHATTARAI, S., SCHELD, M., CLARNER, T., FALLIER-BECKER, P., BEYER, C., ROHR, S. O., SCHMITZ, C., HOCHSTRASSER, T., SCHWEIGER, F., AMOR, S., HORN-BOCHTLER, A., DENECKE, B., NYAMOYA, S. & KIPP, M. 2019. Oligodendrocyte degeneration and concomitant microglia activation directs peripheral immune cells into the forebrain. *Neurochem Int*, 126, 139-153.
- COMI, G., JEFFERY, D., KAPPOS, L., MONTALBAN, X., BOYKO, A., ROCCA, M. A., FILIPPI, M. & GROUP, A. S. 2012. Placebo-controlled trial of oral laquinimod for multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 366, 1000-9.
- COMI, G., MARTINELLI, V., RODEGHER, M., MOIOLA, L., BAJENARU, O., CARRA, A., ELOVAARA, I., FAZEKAS, F., HARTUNG, H. P., HILLERT, J., KING, J., KOMOLY, S., LUBETZKI, C., MONTALBAN, X., MYHR, K. M., RAVNBORG, M., RIECKMANN, P., WYNN, D., YOUNG, C., FILIPPI, M. & PRE, C. S. G. 2009. Effect of glatiramer acetate on conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome (PreCIS study): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 374, 1503-11.
- COMI, G., PULIZZI, A., ROVARIS, M., ABRAMSKY, O., ARBIZU, T., BOIKO, A., GOLD, R., HAVRDOVA, E., KOMOLY, S., SELMAJ, K., SHARRACK, B., FILIPPI, M. & GROUP, L. A. Q. S. 2008. Effect of laquinimod on MRI-monitored disease activity in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study. *Lancet*, 371, 2085-92.
- COMPSTON, A. & COLES, A. 2008. Multiple sclerosis. *Lancet*, 372, 1502-17.
- CONFAVREUX, C. & VUKUSIC, S. 2006. Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. *Brain*, 129, 606-16.
- CRAWSHAW, A. A. & ROBERTSON, N. P. 2017. The role of TSPO PET in assessing neuroinflammation. *J Neurol*, 264, 1825-1827.
- DAL CANTO, M. C. & LIPTON, H. L. 1977. Multiple sclerosis. Animal model: Theiler's virus infection in mice. *Am J Pathol*, 88, 497-500.
- DALTON, C. M., CHARD, D. T., DAVIES, G. R., MISZKIEL, K. A., ALTMANN, D. R., FERNANDO, K., PLANT, G. T., THOMPSON, A. J. & MILLER, D. H. 2004. Early development of multiple sclerosis is associated with progressive grey matter atrophy in patients presenting with clinically isolated syndromes. *Brain*, 127, 1101-7.
- DE KLEIJN, K. M. A. & MARTENS, G. J. M. 2020. Molecular Effects of FDA-Approved Multiple Sclerosis Drugs on Glial Cells and Neurons of the Central Nervous System. *Int J Mol Sci*, 21.
- DEAN, G. 1967. Annual incidence, prevalence, and mortality of multiple sclerosis in white South-African-born and in white immigrants to South Africa. *Br Med J*, 2, 724-30.
- DENIC, A., JOHNSON, A. J., BIEBER, A. J., WARRINGTON, A. E., RODRIGUEZ, M. & PIRKO, I. 2011. The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology*, 18, 21-9.

- DERFUSS, T., MEHLING, M., PAPADOPOULOU, A., BAR-OR, A., COHEN, J. A. & KAPPOS, L. 2020. Advances in oral immunomodulating therapies in relapsing multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 19, 336-347.
- DI FILIPPO, M., PORTACCIO, E., MANCINI, A. & CALABRESI, P. 2018. Multiple sclerosis and cognition: synaptic failure and network dysfunction. *Nat Rev Neurosci*, 19, 599-609.
- DISANTO, G., BERLANGA, A. J., HANDEL, A. E., PARA, A. E., BURRELL, A. M., FRIES, A., HANDUNNETTHI, L., DE LUCA, G. C. & MORAHAN, J. M. 2010. Heterogeneity in multiple sclerosis: scratching the surface of a complex disease. *Autoimmune Dis*, 2011, 932351.
- DYMENT, D. A., EBERS, G. C. & SADOVNICK, A. D. 2004. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 3, 104-10.
- ELIAN, M. & DEAN, G. 1993. Motor neuron disease and multiple sclerosis among immigrants to England from the Indian subcontinent, the Caribbean, and east and west Africa. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 56, 454-7.
- FASBENDER, P. & KOLMEL, H. W. 2008. Incidence of multiple sclerosis in the urban area of Erfurt, Thuringia, Germany. *Neuroepidemiology*, 30, 147-51.
- FEDERATION, M. S. I. 2020. Atlas of MS - 3rd Edition (September 2020)
- <https://www.atlasofms.org/map/global/epidemiology/number-of-people-with-ms>
- FERGUSON, B., MATYSZAK, M. K., ESIRI, M. M. & PERRY, V. H. 1997. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain*, 120 (Pt 3), 393-9.
- FERNANDEZ-MENENDEZ, S., FERNANDEZ-MORAN, M., FERNANDEZ-VEGA, I., PEREZ-ALVAREZ, A. & VILLAFANI-ECHAZU, J. 2016. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. From evidence to therapeutic strategies. *J Neurol Sci*, 361, 213-9.
- FIERZ, W. 2017. Multiple sclerosis: an example of pathogenic viral interaction? *Virology*, 14, 42.
- FILIPPI, M., BRUCK, W., CHARD, D., FAZEKAS, F., GEURTS, J. J. G., ENZINGER, C., HAMETNER, S., KUHLMANN, T., PREZIOSA, P., ROVIRA, A., SCHMIERER, K., STADELMANN, C., ROCCA, M. A., ATTENDEES OF THE CORRELATION BETWEEN, P. & WORKSHOP, M. R. I. F. I. M. 2019. Association between pathological and MRI findings in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 18, 198-210.
- FILIPPI, M., ROCCA, M. A., PAGANI, E., DE STEFANO, N., JEFFERY, D., KAPPOS, L., MONTALBAN, X., BOYKO, A. N., COMI, G. & GROUP, A. S. 2014. Placebo-controlled trial of oral laquinimod in multiple sclerosis: MRI evidence of an effect on brain tissue damage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 85, 851-8.
- FISHER, E., LEE, J. C., NAKAMURA, K. & RUDICK, R. A. 2008. Gray matter atrophy in multiple sclerosis: a longitudinal study. *Ann Neurol*, 64, 255-65.
- FRANKLIN, R. J. & KOTTER, M. R. 2008. The biology of CNS remyelination: the key to therapeutic advances. *J Neurol*, 255 Suppl 1, 19-25.
- FRISCHER, J. M., BRAMOW, S., DAL-BIANCO, A., LUCCHINETTI, C. F., RAUSCHKA, H., SCHMIDBAUER, M., LAURSEN, H., SORESENSEN, P. S. & LASSMANN, H. 2009. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*, 132, 1175-89.
- FU, L., MATTHEWS, P. M., DE STEFANO, N., WORSLEY, K. J., NARAYANAN, S., FRANCIS, G. S., ANTEL, J. P., WOLFSON, C. & ARNOLD, D. L. 1998. Imaging axonal damage of normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain*, 121 (Pt 1), 103-13.

- G COMI, T. V., A BOYKO, P VERMERSCH, T ZIEMSEN, X MONTALBAN, F LUBLIN, N SASSON, Y DADON, J STEINERMAN, V KNAPPERTZ 2017. CONCERTO: a placebo-controlled trial of oral laquinimod in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *ECTRIMS ABSTRACT* 233.
- GALEA INGO, B. V., HUGH PERRY 2007. What is immune privilege (not)? *Trends in Immunology*.
- GARCIA-MIRALLES, M., YUSOF, N., TAN, J. Y., RADULESCU, C. I., SIDIK, H., TAN, L. J., BELINSON, H., ZACH, N., HAYDEN, M. R. & POULADI, M. A. 2019. Laquinimod Treatment Improves Myelination Deficits at the Transcriptional and Ultrastructural Levels in the YAC128 Mouse Model of Huntington Disease. *Mol Neurobiol*, 56, 4464-4478.
- GEURTS, J. J. & BARKHOF, F. 2008. Grey matter pathology in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 7, 841-51.
- GHOLAMZAD, M., EBTEKAR, M., ARDESTANI, M. S., AZIMI, M., MAHMODI, Z., MOUSAVI, M. J. & ASLANI, S. 2019. A comprehensive review on the treatment approaches of multiple sclerosis: currently and in the future. *Inflamm Res*, 68, 25-38.
- GIOVANNONI, G., KNAPPERTZ, V., STEINERMAN, J. R., TANSY, A. P., LI, T., KRIEGER, S., UCCELLI, A., UITDEHAAG, B. M. J., MONTALBAN, X., HARTUNG, H. P., SORMANI, M. P., CREE, B. A. C., LUBLIN, F. & BARKHOF, F. 2020. A randomized, placebo-controlled phase 2 trial of laquinimod in primary progressive multiple sclerosis. *Neurology*.
- GLASS, C. K., SAIJO, K., WINNER, B., MARCHETTO, M. C. & GAGE, F. H. 2010. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140, 918-34.
- GOLDSCHMIDT, T., ANTEL, J., KONIG, F. B., BRUCK, W. & KUHLMANN, T. 2009. Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity. *Neurology*, 72, 1914-21.
- GOODIN, D. S., FROHMAN, E. M., GARMANY, G. P., JR., HALPER, J., LIKOSKY, W. H., LUBLIN, F. D., SILBERBERG, D. H., STUART, W. H., VAN DEN NOORT, S., THERAPEUTICS, TECHNOLOGY ASSESSMENT SUBCOMMITTEE OF THE AMERICAN ACADEMY OF, N. & THE, M. S. C. F. C. P. G. 2002. Disease modifying therapies in multiple sclerosis: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines. *Neurology*, 58, 169-78.
- GOURRAUD, P. A., HARBO, H. F., HAUSER, S. L. & BARANZINI, S. E. 2012. The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunol Rev*, 248, 87-103.
- GRANT, W. B. 2006. Epidemiology of disease risks in relation to vitamin D insufficiency. *Prog Biophys Mol Biol*, 92, 65-79.
- GRIMAUD, J., BARKER, G. J., WANG, L., LAI, M., MACMANUS, D. G., WEBB, S. L., THOMPSON, A. J., MCDONALD, W. I., TOFTS, P. S. & MILLER, D. H. 1999. Correlation of magnetic resonance imaging parameters with clinical disability in multiple sclerosis: a preliminary study. *J Neurol*, 246, 961-7.
- GUREVICH, M., GRITZMAN, T., ORBACH, R., TULLER, T., FELDMAN, A. & ACHIRON, A. 2010. Laquinimod suppress antigen presentation in relapsing-remitting multiple sclerosis: in-vitro high-throughput gene expression study. *J Neuroimmunol*, 221, 87-94.
- HANDEL, A. E., WILLIAMSON, A. J., DISANTO, G., HANDUNNETTHI, L., GIOVANNONI, G. & RAMAGOPALAN, S. V. 2010. An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLoS One*, 5.

- HAUSER, S. L. & OKSENBERG, J. R. 2006. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron*, 52, 61-76.
- HAWKER, K., O'CONNOR, P., FREEDMAN, M. S., CALABRESI, P. A., ANTEL, J., SIMON, J., HAUSER, S., WAUBANT, E., VOLLMER, T., PANITCH, H., ZHANG, J., CHIN, P., SMITH, C. H. & GROUP, O. T. 2009. Rituximab in patients with primary progressive multiple sclerosis: results of a randomized double-blind placebo-controlled multicenter trial. *Ann Neurol*, 66, 460-71.
- HEDSTROM, A. K., HILLERT, J., OLSSON, T. & ALFREDSSON, L. 2013. Smoking and multiple sclerosis susceptibility. *Eur J Epidemiol*, 28, 867-74.
- HIREMATH, M. M., SAITO, Y., KNAPP, G. W., TING, J. P., SUZUKI, K. & MATSUSHIMA, G. K. 1998. Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol*, 92, 38-49.
- HOCHSTRASSER, T., EXNER, G. L., NYAMOYA, S., SCHMITZ, C. & KIPP, M. 2017. Cuprizone-Containing Pellets Are Less Potent to Induce Consistent Demyelination in the Corpus Callosum of C57BL/6 Mice. *J Mol Neurosci*, 61, 617-624.
- JACOBS LD, B. R., SIMON JH, KINKEL RP, BROWNSCHIEDLE CM, MURRAY TJ, SIMONIAN NA, SLASOR PJ, SANDROCK AW, AND THE CHAMPS STUDY GROUP 2001. Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. Jacobs LD,*⁽¹⁾ Beck RW, Simon JH, Kinkel RP, Brownschidle CM, Murray TJ, Simonian NA, Slasor PJ, Sandrock AW, and the CHAMPS Study Group. *N Engl J Med* 2000;343:898-904. *Am J Ophthalmol*, 131, 154-155.
- JACOBSEN, M., CEPOK, S., QUAK, E., HAPPEL, M., GABER, R., ZIEGLER, A., SCHOCK, S., OERTEL, W. H., SOMMER, N. & HEMMER, B. 2002. Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain*, 125, 538-50.
- JOLIVEL, V., LUESSI, F., MASRI, J., KRAUS, S. H., HUBO, M., POISA-BEIRO, L., KLEBOW, S., PATERKA, M., YOGEV, N., TUMANI, H., FURLAN, R., SIFFRIN, V., JONULEIT, H., ZIPP, F. & WAISMAN, A. 2013. Modulation of dendritic cell properties by laquinimod as a mechanism for modulating multiple sclerosis. *Brain*, 136, 1048-66.
- KAPOOR, R., HO, P. R., CAMPBELL, N., CHANG, I., DEYKIN, A., FORRESTAL, F., LUCAS, N., YU, B., ARNOLD, D. L., FREEDMAN, M. S., GOLDMAN, M. D., HARTUNG, H. P., HAVRDOVA, E. K., JEFFERY, D., MILLER, A., SELLEBJERG, F., CADAVID, D., MIKOL, D., STEINER, D. & INVESTIGATORS, A. 2018. Effect of natalizumab on disease progression in secondary progressive multiple sclerosis (ASCEND): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial with an open-label extension. *Lancet Neurol*, 17, 405-415.
- KAPPOS, L., BAR-OR, A., CREE, B. A. C., FOX, R. J., GIOVANNONI, G., GOLD, R., VERMERSCH, P., ARNOLD, D. L., ARNOULD, S., SCHERZ, T., WOLF, C., WALLSTROM, E., DAHLKE, F. & INVESTIGATORS, E. C. 2018. Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet*, 391, 1263-1273.
- KATSUMOTO, A., MIRANDA, A. S., BUTOVSKY, O., TEIXEIRA, A. L., RANSOHOFF, R. M. & LAMB, B. T. 2018. Laquinimod attenuates inflammation by modulating macrophage functions in traumatic brain injury mouse model. *J Neuroinflammation*, 15, 26.
- KAYE, J., PIRYATINSKY, V., BIRNBERG, T., HINGALY, T., RAYMOND, E., KASHI, R., AMIT-ROMACH, E., CABALLERO, I. S., TOWFIC, F., ATOR, M. A.,

- RUBINSTEIN, E., LAIFENFELD, D., ORBACH, A., SHINAR, D., MARANTZ, Y., GROSSMAN, I., KNAPPERTZ, V., HAYDEN, M. R. & LAUFER, R. 2016. Laquinimod arrests experimental autoimmune encephalomyelitis by activating the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, E6145-E6152.
- KESSEL, A., HAJ, T., PERI, R., SNIR, A., MELAMED, D., SABO, E. & TOUBI, E. 2012. Human CD19(+)CD25(high) B regulatory cells suppress proliferation of CD4(+) T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Autoimmun Rev*, 11, 670-7.
- KIPP, M. & BEYER, C. 2009. Impact of sex steroids on neuroinflammatory processes and experimental multiple sclerosis. *Front Neuroendocrinol*, 30, 188-200.
- KIPP, M., CLARNER, T., DANG, J., COPRAY, S. & BEYER, C. 2009. The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta Neuropathol*, 118, 723-36.
- KIPP, M., NYAMOYA, S., HOCHSTRASSER, T. & AMOR, S. 2017. Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. *Brain Pathol*, 27, 123-137.
- KIPP, M., VAN DER STAR, B., VOGEL, D. Y., PUENTES, F., VAN DER VALK, P., BAKER, D. & AMOR, S. 2012a. Experimental in vivo and in vitro models of multiple sclerosis: EAE and beyond. *Mult Scler Relat Disord*, 1, 15-28.
- KIPP, M., VAN DER VALK, P. & AMOR, S. 2012b. Pathology of multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 11, 506-17.
- KRAMANN, N., MENKEN, L., HAYARDENY, L., HANISCH, U. K. & BRUCK, W. 2016. Laquinimod prevents cuprizone-induced demyelination independent of Toll-like receptor signaling. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 3, e233.
- KUCUKALI, C. I., KURTUNCU, M., COBAN, A., CEBI, M. & TUZUN, E. 2015. Epigenetics of multiple sclerosis: an updated review. *Neuromolecular Med*, 17, 83-96.
- KUHLMANN, T., LASSMANN, H. & BRUCK, W. 2008. Diagnosis of inflammatory demyelination in biopsy specimens: a practical approach. *Acta Neuropathol*, 115, 275-87.
- KUHLMANN, T., LINGFELD, G., BITSCH, A., SCHUCHARDT, J. & BRUCK, W. 2002. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain*, 125, 2202-12.
- KUHLMANN, T., LUDWIN, S., PRAT, A., ANTEL, J., BRUCK, W. & LASSMANN, H. 2017. An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol*, 133, 13-24.
- KURTZKE, J. F. 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, 33, 1444-52.
- KURTZKE, J. F. 1991. Multiple sclerosis: changing times. *Neuroepidemiology*, 10, 1-8.
- KUTZELNIGG, A. & LASSMANN, H. 2005. Cortical lesions and brain atrophy in MS. *J Neurol Sci*, 233, 55-9.
- KUTZELNIGG, A., LUCCHINETTI, C. F., STADELMANN, C., BRUCK, W., RAUSCHKA, H., BERGMANN, M., SCHMIDBAUER, M., PARISI, J. E. & LASSMANN, H. 2005. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain*, 128, 2705-12.
- LASSMANN, H. 2018. Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 8.
- LINCOLN, M. R., MONTPETIT, A., CADER, M. Z., SAARELA, J., DYMENT, D. A., TIISLAR, M., FERRETTI, V., TIENARI, P. J., SADOVNICK, A. D., PELTONEN, L., EBERS, G. C. & HUDSON, T. J. 2005. A predominant role for the HLA class

- II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis. *Nat Genet*, 37, 1108-12.
- LINDNER, M., FOKUHL, J., LINSMEIER, F., TREBST, C. & STANGEL, M. 2009. Chronic toxic demyelination in the central nervous system leads to axonal damage despite remyelination. *Neurosci Lett*, 453, 120-5.
- LINKER, R. A., LEE, D. H., DEMIR, S., WIESE, S., KRUSE, N., SIGLIANTI, I., GERHARDT, E., NEUMANN, H., SENDTNER, M., LUHDER, F. & GOLD, R. 2010. Functional role of brain-derived neurotrophic factor in neuroprotective autoimmunity: therapeutic implications in a model of multiple sclerosis. *Brain*, 133, 2248-63.
- LOCATELLI, G., WORTGE, S., BUCH, T., INGOLD, B., FROMMER, F., SOBOTTKA, B., KRUGER, M., KARRAM, K., BUHLMANN, C., BECHMANN, I., HEPPNER, F. L., WAISMAN, A. & BECHER, B. 2012. Primary oligodendrocyte death does not elicit anti-CNS immunity. *Nat Neurosci*, 15, 543-50.
- LOURENCO, E. V., WONG, M., HAHN, B. H., PALMA-DIAZ, M. F. & SKAGGS, B. J. 2014. Laquinimod delays and suppresses nephritis in lupus-prone mice and affects both myeloid and lymphoid immune cells. *Arthritis Rheumatol*, 66, 674-85.
- LUBLIN, F., MILLER, D. H., FREEDMAN, M. S., CREE, B. A. C., WOLINSKY, J. S., WEINER, H., LUBETZKI, C., HARTUNG, H. P., MONTALBAN, X., UITDEHAAG, B. M. J., MERSCHHEMKE, M., LI, B., PUTZKI, N., LIU, F. C., HARING, D. A., KAPPOS, L. & INVESTIGATORS, I. S. 2016. Oral fingolimod in primary progressive multiple sclerosis (INFORMS): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 387, 1075-1084.
- LUBLIN, F. D. & REINGOLD, S. C. 1996. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*, 46, 907-11.
- LUBLIN, F. D., REINGOLD, S. C., COHEN, J. A., CUTTER, G. R., SORENSEN, P. S., THOMPSON, A. J., WOLINSKY, J. S., BALCER, L. J., BANWELL, B., BARKHOF, F., BEBO, B., JR., CALABRESI, P. A., CLANET, M., COMI, G., FOX, R. J., FREEDMAN, M. S., GOODMAN, A. D., INGLESE, M., KAPPOS, L., KIESEIER, B. C., LINCOLN, J. A., LUBETZKI, C., MILLER, A. E., MONTALBAN, X., O'CONNOR, P. W., PETKAU, J., POZZILLI, C., RUDICK, R. A., SORMANI, M. P., STUVE, O., WAUBANT, E. & POLMAN, C. H. 2014. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*, 83, 278-86.
- LUCCHINETTI, C., BRUCK, W., PARISI, J., SCHEITHAUER, B., RODRIGUEZ, M. & LASSMANN, H. 2000. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol*, 47, 707-17.
- LUCCHINETTI, C. F., POPESCU, B. F., BUNYAN, R. F., MOLL, N. M., ROEMER, S. F., LASSMANN, H., BRUCK, W., PARISI, J. E., SCHEITHAUER, B. W., GIANNINI, C., WEIGAND, S. D., MANDREKAR, J. & RANSOHOFF, R. M. 2011. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 365, 2188-97.
- LUDWIN, S. K. 1980. Chronic demyelination inhibits remyelination in the central nervous system. An analysis of contributing factors. *Lab Invest*, 43, 382-7.
- MAGGI, P., MACRI, S. M., GAITAN, M. I., LEIBOVITCH, E., WHOLER, J. E., KNIGHT, H. L., ELLIS, M., WU, T., SILVA, A. C., MASSACESI, L., JACOBSON, S., WESTMORELAND, S. & REICH, D. S. 2014. The formation of inflammatory demyelinated lesions in cerebral white matter. *Ann Neurol*, 76, 594-608.

- MARS, L. T., SAIKALI, P., LIBLAU, R. S. & ARBOUR, N. 2011. Contribution of CD8 T lymphocytes to the immuno-pathogenesis of multiple sclerosis and its animal models. *Biochim Biophys Acta*, 1812, 151-61.
- MATTNER, F., STAYKOVA, M., BERGHOFER, P., WONG, H. J., FORDHAM, S., CALLAGHAN, P., JACKSON, T., PHAM, T., GREGOIRE, M. C., ZAHRA, D., RAHARDJO, G., LINARES, D. & KATSIFIS, A. 2013. Central nervous system expression and PET imaging of the translocator protein in relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Nucl Med*, 54, 291-8.
- MCDONALD, W. I., COMPSTON, A., EDAN, G., GOODKIN, D., HARTUNG, H. P., LUBLIN, F. D., MCFARLAND, H. F., PATY, D. W., POLMAN, C. H., REINGOLD, S. C., SANDBERG-WOLLHEIM, M., SIBLEY, W., THOMPSON, A., VAN DEN NOORT, S., WEINSHENKER, B. Y. & WOLINSKY, J. S. 2001. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 50, 121-7.
- MISHRA, M. K., WANG, J., KEOUGH, M. B., FAN, Y., SILVA, C., SLOKA, S., HAYARDENY, L., BRUCK, W. & YONG, V. W. 2014. Laquinimod reduces neuroaxonal injury through inhibiting microglial activation. *Ann Clin Transl Neurol*, 1, 409-22.
- MIX, E., MEYER-RIENECKER, H. & ZETTL, U. K. 2008. Animal models of multiple sclerosis for the development and validation of novel therapies - potential and limitations. *J Neurol*, 255 Suppl 6, 7-14.
- MOORE, S., KHALAJ, A. J., YOON, J., PATEL, R., HANNSUN, G., YOO, T., SASIDHAR, M., MARTINEZ-TORRES, L., HAYARDENY, L. & TIWARI-WOODRUFF, S. K. 2013. Therapeutic laquinimod treatment decreases inflammation, initiates axon remyelination, and improves motor deficit in a mouse model of multiple sclerosis. *Brain Behav*, 3, 664-82.
- MORELL, P., BARRETT, C. V., MASON, J. L., TOEWS, A. D., HOSTETTLER, J. D., KNAPP, G. W. & MATSUSHIMA, G. K. 1998. Gene expression in brain during cuprizone-induced demyelination and remyelination. *Mol Cell Neurosci*, 12, 220-7.
- NACK, A., BRENDDEL, M., NEDELCU, J., DAERR, M., NYAMOYA, S., BEYER, C., FOCKE, C., DEUSSING, M., HOORNAERT, C., PONSARTS, P., SCHMITZ, C., BARTENSTEIN, P., ROMINGER, A. & KIPP, M. 2019. Expression of Translocator Protein and [18F]-GE180 Ligand Uptake in Multiple Sclerosis Animal Models. *Cells*, 8.
- NAIK, P. & CUCULLO, L. 2012. In vitro blood-brain barrier models: current and perspective technologies. *J Pharm Sci*, 101, 1337-54.
- NEDELCU, J., REINBACH, C., BRENDDEL, M., ROMINGER, A., KAYE, J., BEHRANGI, N., JIANGSHAN, Z., SCHMITZ, C. & KIPP, M. 2019. Laquinimod ameliorates secondary brain inflammation. *Neurobiol Dis*, 134, 104675.
- NELSON, A. L., BIEBER, A. J. & RODRIGUEZ, M. 2004. Contrasting murine models of MS. *Int MS J*, 11, 95-9.
- NELSON, F., POONAWALLA, A., HOU, P., WOLINSKY, J. S. & NARAYANA, P. A. 2008. 3D MPRAGE improves classification of cortical lesions in multiple sclerosis. *Mult Scler*, 14, 1214-9.
- NIMMERJAHN, A., KIRCHHOFF, F. & HELMCHEN, F. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308, 1314-8.
- NORKUTE, A., HIEBLE, A., BRAUN, A., JOHANN, S., CLARNER, T., BAUMGARTNER, W., BEYER, C. & KIPP, M. 2009. Cuprizone treatment

- induces demyelination and astrogliosis in the mouse hippocampus. *J Neurosci Res*, 87, 1343-55.
- NOSEWORTHY, J. H., LUCCHINETTI, C., RODRIGUEZ, M. & WEINSHENKER, B. G. 2000a. Multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 343, 938-52.
- NOSEWORTHY, J. H., WOLINSKY, J. S., LUBLIN, F. D., WHITAKER, J. N., LINDE, A., GJORSTRUP, P. & SULLIVAN, H. C. 2000b. Linomide in relapsing and secondary progressive MS: part I: trial design and clinical results. North American Linomide Investigators. *Neurology*, 54, 1726-33.
- NYAMOYA, S., STEINLE, J., CHRZANOWSKI, U., KAYE, J., SCHMITZ, C., BEYER, C. & KIPP, M. 2019. Laquinimod Supports Remyelination in Non-Supportive Environments. *Cells*, 8.
- OKSENBERG, J. R. & BARCELLOS, L. F. 2005. Multiple sclerosis genetics: leaving no stone unturned. *Genes Immun*, 6, 375-87.
- PANITCH, H., MILLER, A., PATY, D., WEINSHENKER, B. & NORTH AMERICAN STUDY GROUP ON INTERFERON BETA-1B IN SECONDARY PROGRESSIVE, M. S. 2004. Interferon beta-1b in secondary progressive MS: results from a 3-year controlled study. *Neurology*, 63, 1788-95.
- PEDOTTI, R., MITCHELL, D., WEDEMEYER, J., KARPUJ, M., CHABAS, D., HATTAB, E. M., TSAI, M., GALLI, S. J. & STEINMAN, L. 2001. An unexpected version of horror autotoxicus: anaphylactic shock to a self-peptide. *Nat Immunol*, 2, 216-22.
- PIRKO, I., LUCCHINETTI, C. F., SRIRAM, S. & BAKSHI, R. 2007. Gray matter involvement in multiple sclerosis. *Neurology*, 68, 634-42.
- PITAROKOILI, K., AMBROSIUS, B., SCHREWE, L., HAYARDENY, L., HAYDEN, M. & GOLD, R. 2014. Laquinimod exerts strong clinical and immunomodulatory effects in Lewis rat experimental autoimmune neuritis. *J Neuroimmunol*, 274, 38-45.
- POLMAN, C., BARKHOF, F., SANDBERG-WOLLHEIM, M., LINDE, A., NORDLE, O., NEDERMAN, T. & LAQUINIMOD IN RELAPSING, M. S. S. G. 2005. Treatment with laquinimod reduces development of active MRI lesions in relapsing MS. *Neurology*, 64, 987-91.
- POSER, C. M. 1986. Pathogenesis of multiple sclerosis. A critical reappraisal. *Acta Neuropathol*, 71, 1-10.
- POSER, S., STICKEL, B., KRTSCH, U., BURCKHARDT, D. & NORDMAN, B. 1989. Increasing incidence of multiple sclerosis in South Lower Saxony, Germany. *Neuroepidemiology*, 8, 207-13.
- POTT, F., GINGELE, S., CLARNER, T., DANG, J., BAUMGARTNER, W., BEYER, C. & KIPP, M. 2009. Cuprizone effect on myelination, astrogliosis and microglia attraction in the mouse basal ganglia. *Brain Res*, 1305, 137-49.
- PRINEAS, J. W., BARNARD, R. O., KWON, E. E., SHARER, L. R. & CHO, E. S. 1993. Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Ann Neurol*, 33, 137-51.
- PROCACCINI, C., DE ROSA, V., PUCINO, V., FORMISANO, L. & MATARESE, G. 2015. Animal models of Multiple Sclerosis. *Eur J Pharmacol*, 759, 182-91.
- PUBCHEM. 2005. Cuprizone (Compound) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cuprizone> [Online]. Pubchem. [Accessed].
- RAASCH, J., ZELLER, N., VAN LOO, G., MERKLER, D., MILDNER, A., ERNY, D., KNOBELOCH, K. P., BETHEA, J. R., WAISMAN, A., KNUST, M., DEL TURCO, D., DELLER, T., BLANK, T., PRILLER, J., BRUCK, W., PASPARAKIS, M. & PRINZ, M. 2011. IkappaB kinase 2 determines oligodendrocyte loss by non-

- cell-autonomous activation of NF-kappaB in the central nervous system. *Brain*, 134, 1184-98.
- RAINE, C. S., CANNELLA, B., HAUSER, S. L. & GENAIN, C. P. 1999. Demyelination in primate autoimmune encephalomyelitis and acute multiple sclerosis lesions: a case for antigen-specific antibody mediation. *Ann Neurol*, 46, 144-60.
- RODRIGUEZ, M. & SCHEITHAUER, B. 1994. Ultrastructure of multiple sclerosis. *Ultrastruct Pathol*, 18, 3-13.
- RUFFINI, F., ROSSI, S., BERGAMASCHI, A., BRAMBILLA, E., FINARDI, A., MOTTA, C., STUDER, V., BARBIERI, F., DE CHIARA, V., HAYARDENY, L., COMI, G., CENTONZE, D. & MARTINO, G. 2013. Laquinimod prevents inflammation-induced synaptic alterations occurring in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mult Scler*, 19, 1084-94.
- RUTHER, B. J., SCHELD, M., DREYMUELLER, D., CLARNER, T., KRESS, E., BRANDENBURG, L. O., SWARTENBROEKX, T., HOORNAERT, C., PONSAERTS, P., FALLIER-BECKER, P., BEYER, C., ROHR, S. O., SCHMITZ, C., CHRZANOWSKI, U., HOCHSTRASSER, T., NYAMOYA, S. & KIPP, M. 2017. Combination of cuprizone and experimental autoimmune encephalomyelitis to study inflammatory brain lesion formation and progression. *Glia*, 65, 1900-1913.
- SADOVNICK, A. D., EISEN, K., EBERS, G. C. & PATY, D. W. 1991. Cause of death in patients attending multiple sclerosis clinics. *Neurology*, 41, 1193-6.
- SCHELD, M., RUTHER, B. J., GROSSE-VELDMANN, R., OHL, K., TENBROCK, K., DREYMULLER, D., FALLIER-BECKER, P., ZENDEDEL, A., BEYER, C., CLARNER, T. & KIPP, M. 2016. Neurodegeneration Triggers Peripheral Immune Cell Recruitment into the Forebrain. *J Neurosci*, 36, 1410-5.
- SCHMIERER, K., MCDOWELL, A., PETROVA, N., CARASSITI, D., THOMAS, D. L. & MIQUEL, M. E. 2018. Quantifying multiple sclerosis pathology in post mortem spinal cord using MRI. *Neuroimage*, 182, 251-258.
- SCHULZE-TOPPHOFF, U., SHETTY, A., VARRIN-DOYER, M., MOLNARFI, N., SAGAN, S. A., SOBEL, R. A., NELSON, P. A. & ZAMVIL, S. S. 2012. Laquinimod, a quinoline-3-carboxamide, induces type II myeloid cells that modulate central nervous system autoimmunity. *PLoS One*, 7, e33797.
- SCHWENKENBECHER, P., WURSTER, U., KONEN, F. F., GINGELE, S., SUHS, K. W., WATTJES, M. P., STANGEL, M. & SKRIPULETZ, T. 2019. Impact of the McDonald Criteria 2017 on Early Diagnosis of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Front Neurol*, 10, 188.
- SEEWANN, A., VRENKEN, H., KOOI, E. J., VAN DER VALK, P., KNOL, D. L., POLMAN, C. H., POUWELS, P. J., BARKHOF, F. & GEURTS, J. J. 2011. Imaging the tip of the iceberg: visualization of cortical lesions in multiple sclerosis. *Mult Scler*, 17, 1202-10.
- SHIRANI, A., OKUDA, D. T. & STUVE, O. 2016. Therapeutic Advances and Future Prospects in Progressive Forms of Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics*, 13, 58-69.
- SIDMAN, R., KOSARAS, B., MISRA, B., SENFT, S. . 1971. *High Resolution Mouse Brain Atlas*: <http://www.hms.harvard.edu/research/brain/atlas.html> [Online]. [Accessed].
- SKRIPULETZ, T., BUSSMANN, J. H., GUDI, V., KOUTSOUDAKI, P. N., PUL, R., MOHARREGH-KHIABANI, D., LINDNER, M. & STANGEL, M. 2010. Cerebellar cortical demyelination in the murine cuprizone model. *Brain Pathol*, 20, 301-12.

- SKRIPULETZ, T., GUDI, V., HACKSTETTE, D. & STANGEL, M. 2011. De- and remyelination in the CNS white and grey matter induced by cuprizone: the old, the new, and the unexpected. *Histol Histopathol*, 26, 1585-97.
- SKRIPULETZ, T., LINDNER, M., KOTSIARI, A., GARDE, N., FOKUHL, J., LINSMEIER, F., TREBST, C. & STANGEL, M. 2008. Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain-dependent. *Am J Pathol*, 172, 1053-61.
- SOLOMON, A. J., BOURDETTE, D. N., CROSS, A. H., APPLEBEE, A., SKIDD, P. M., HOWARD, D. B., SPAIN, R. I., CAMERON, M. H., KIM, E., MASS, M. K., YADAV, V., WHITHAM, R. H., LONGBRAKE, E. E., NAISMITH, R. T., WU, G. F., PARKS, B. J., WINGERCHUK, D. M., RABIN, B. L., TOLEDANO, M., TOBIN, W. O., KANTARCI, O. H., CARTER, J. L., KEEGAN, B. M. & WEINSHENKER, B. G. 2016. The contemporary spectrum of multiple sclerosis misdiagnosis: A multicenter study. *Neurology*, 87, 1393-9.
- SORENSEN, P. S., COMI, G., VOLLMER, T. L., MONTALBAN, X., KAPPOS, L., DADON, Y., GORFINE, T., MARGALIT, M., SASSON, N., RUBINCHICK, S. & KNAPPERTZ, V. 2017. Laquinimod Safety Profile: Pooled Analyses from the ALLEGRO and BRAVO Trials. *Int J MS Care*, 19, 16-24.
- SRIRAM, S. & STEINER, I. 2005. Experimental allergic encephalomyelitis: a misleading model of multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 58, 939-45.
- STADELMANN, C., WEGNER, C. & BRUCK, W. 2011. Inflammation, demyelination, and degeneration - recent insights from MS pathology. *Biochim Biophys Acta*, 1812, 275-82.
- STEINMAN, L. & ZAMVIL, S. S. 2006. How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 60, 12-21.
- STIDWORTHY, M. F., GENOUD, S., SUTER, U., MANTEI, N. & FRANKLIN, R. J. 2003. Quantifying the early stages of remyelination following cuprizone-induced demyelination. *Brain Pathol*, 13, 329-39.
- STYS, P. K., ZAMPONI, G. W., VAN MINNEN, J. & GEURTS, J. J. 2012. Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nat Rev Neurosci*, 13, 507-14.
- SUN, J., SHEN, X., DONG, J., ZHAO, J., ZUO, L., WANG, H., LI, Y., ZHU, W., GONG, J. & LI, J. 2016. Corrigendum to "Laquinimod ameliorates spontaneous colitis in interleukin-10-gene-deficient mice with improved barrier function" [Int. Immunopharmacol. (2015) 423-432]. *Int Immunopharmacol*, 35, 341.
- THEILER, M. 1934. Spontaneous Encephalomyelitis of Mice--a New Virus Disease. *Science*, 80, 122.
- THOMPSON, A. J., BANWELL, B. L., BARKHOF, F., CARROLL, W. M., COETZEE, T., COMI, G., CORREALE, J., FAZEKAS, F., FILIPPI, M., FREEDMAN, M. S., FUJIHARA, K., GALETTA, S. L., HARTUNG, H. P., KAPPOS, L., LUBLIN, F. D., MARRIE, R. A., MILLER, A. E., MILLER, D. H., MONTALBAN, X., MOWRY, E. M., SORENSEN, P. S., TINTORE, M., TRABOULSEE, A. L., TROJANO, M., UITDEHAAG, B. M. J., VUKUSIC, S., WAUBANT, E., WEINSHENKER, B. G., REINGOLD, S. C. & COHEN, J. A. 2018. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*, 17, 162-173.
- THONE, J., ELLRICHMANN, G., SEUBERT, S., PERUGA, I., LEE, D. H., CONRAD, R., HAYARDENY, L., COMI, G., WIESE, S., LINKER, R. A. & GOLD, R. 2012. Modulation of autoimmune demyelination by laquinimod via induction of brain-derived neurotrophic factor. *Am J Pathol*, 180, 267-74.
- THONE, J. & LINKER, R. A. 2016. Laquinimod in the treatment of multiple sclerosis: a review of the data so far. *Drug Des Devel Ther*, 10, 1111-8.

- TORKILDSEN, O., BRUNBORG, L. A., MYHR, K. M. & BO, L. 2008. The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurol Scand Suppl*, 188, 72-6.
- TOUBI, E., NUSSBAUM, S., STAUN-RAM, E., SNIR, A., MELAMED, D., HAYARDENY, L. & MILLER, A. 2012. Laquinimod modulates B cells and their regulatory effects on T cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 251, 45-54.
- TRAPP, B. D. & NAVE, K. A. 2008. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci*, 31, 247-69.
- TROTTER, J. L., CLARK, H. B., COLLINS, K. G., WEGESCHIEDE, C. L. & SCARPELLINI, J. D. 1987. Myelin proteolipid protein induces demyelinating disease in mice. *J Neurol Sci*, 79, 173-88.
- TSUNODA, I. & FUJINAMI, R. S. 2002. Inside-Out versus Outside-In models for virus induced demyelination: axonal damage triggering demyelination. *Springer Semin Immunopathol*, 24, 105-25.
- TUBRIDY, N., BEHAN, P. O., CAPILDEO, R., CHAUDHURI, A., FORBES, R., HAWKINS, C. P., HUGHES, R. A., PALACE, J., SHARRACK, B., SWINGLER, R., YOUNG, C., MOSELEY, I. F., MACMANUS, D. G., DONOGHUE, S. & MILLER, D. H. 1999. The effect of anti-alpha4 integrin antibody on brain lesion activity in MS. The UK Antegren Study Group. *Neurology*, 53, 466-72.
- VAN DER STAR, B. J., VOGEL, D. Y., KIPP, M., PUENTES, F., BAKER, D. & AMOR, S. 2012. In vitro and in vivo models of multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 11, 570-88.
- VAN DER VALK, P. & DE GROOT, C. J. 2000. Staging of multiple sclerosis (MS) lesions: pathology of the time frame of MS. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 26, 2-10.
- VAN HORSSSEN, J., SINGH, S., VAN DER POL, S., KIPP, M., LIM, J. L., PEFEROEN, L., GERRITSEN, W., KOOI, E. J., WITTE, M. E., GEURTS, J. J., DE VRIES, H. E., PEFEROEN-BAERT, R., VAN DEN ELSEN, P. J., VAN DER VALK, P. & AMOR, S. 2012. Clusters of activated microglia in normal-appearing white matter show signs of innate immune activation. *J Neuroinflammation*, 9, 156.
- VARRIN-DOYER, M., PEKAREK, K. L., SPENCER, C. M., BERNARD, C. C., SOBEL, R. A., CREE, B. A., SCHULZE-TOPPHOFF, U. & ZAMVIL, S. S. 2016. Treatment of spontaneous EAE by laquinimod reduces Tfh, B cell aggregates, and disease progression. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 3, e272.
- VARRIN-DOYER, M., ZAMVIL, S. S. & SCHULZE-TOPPHOFF, U. 2014. Laquinimod, an up-and-coming immunomodulatory agent for treatment of multiple sclerosis. *Exp Neurol*, 262 Pt A, 66-71.
- VENTURINI, G. 1973. Enzymic activities and sodium, potassium and copper concentrations in mouse brain and liver after cuprizone treatment in vivo. *J Neurochem*, 21, 1147-51.
- VERDEN, D. & MACKLIN, W. B. 2016. Neuroprotection by central nervous system remyelination: Molecular, cellular, and functional considerations. *J Neurosci Res*, 94, 1411-1420.
- VOLLMER, T. L., SORENSEN, P. S., SELMAJ, K., ZIPP, F., HAVRDOVA, E., COHEN, J. A., SASSON, N., GILGUN-SHERKI, Y., ARNOLD, D. L. & GROUP, B. S. 2014. A randomized placebo-controlled phase III trial of oral laquinimod for multiple sclerosis. *J Neurol*, 261, 773-83.
- WEGNER, C., STADELMANN, C., PFORTNER, R., RAYMOND, E., FEIGELSON, S., ALON, R., TIMAN, B., HAYARDENY, L. & BRUCK, W. 2010. Laquinimod interferes with migratory capacity of T cells and reduces IL-17 levels, inflammatory demyelination and acute axonal damage in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 227, 133-43.

- WEINER, H. L. 2008. A shift from adaptive to innate immunity: a potential mechanism of disease progression in multiple sclerosis. *J Neurol*, 255 Suppl 1, 3-11.
- WEINSHENKER, B. G., BASS, B., RICE, G. P., NOSEWORTHY, J., CARRIERE, W., BASKERVILLE, J. & EBERS, G. C. 1989. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain*, 112 (Pt 1), 133-46.
- WEKERLE, H. 2008. Lessons from multiple sclerosis: models, concepts, observations. *Ann Rheum Dis*, 67 Suppl 3, iii56-60.
- WESTERLIND, H., RAMANUJAM, R., UVEHAG, D., KUJA-HALKOLA, R., BOMAN, M., BOTTAI, M., LICHTENSTEIN, P. & HILLERT, J. 2014. Modest familial risks for multiple sclerosis: a registry-based study of the population of Sweden. *Brain*, 137, 770-8.
- YAKIMOV, V., SCHWEIGER, F., ZHAN, J., BEHRANGI, N., HORN, A., SCHMITZ, C., HOCHSTRASSER, T. & KIPP, M. 2019. Continuous cuprizone intoxication allows active experimental autoimmune encephalomyelitis induction in C57BL/6 mice. *Histochem Cell Biol*, 152, 119-131.
- YANG, J. S., XU, L. Y., XIAO, B. G., HEDLUND, G. & LINK, H. 2004. Laquinimod (ABR-215062) suppresses the development of experimental autoimmune encephalomyelitis, modulates the Th1/Th2 balance and induces the Th3 cytokine TGF-beta in Lewis rats. *J Neuroimmunol*, 156, 3-9.
- ZETTL, U. K., STUVE, O. & PATEJDL, R. 2012. Immune-mediated CNS diseases: a review on nosological classification and clinical features. *Autoimmun Rev*, 11, 167-73.
- ZIEMSEN, T., TUMANI, H., SEHR, T., THOMAS, K., PAUL, F., RICHTER, N., SAMARA, E., SPIEGELSTEIN, O., SORANI, E., BAR-ILAN, O., MIMROD, D. & HAYARDENY, L. 2017. Safety and in vivo immune assessment of escalating doses of oral laquinimod in patients with RRMS. *J Neuroinflammation*, 14, 172.
- ZOU, L. P., ABBAS, N., VOLKMANN, I., NENNESMO, I., LEVI, M., WAHREN, B., WINBLAD, B., HEDLUND, G. & ZHU, J. 2002. Suppression of experimental autoimmune neuritis by ABR-215062 is associated with altered Th1/Th2 balance and inhibited migration of inflammatory cells into the peripheral nerve tissue. *Neuropharmacology*, 42, 731-9.

VI. Eidesstattliche Erklärung

Reinbach, Christin Rebecca

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Der Einfluss zytoprotektiver Eigenschaften on Laquinimod auf periphere
Immunzellrekrutierung in das Telencephalon“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 21.11.2021

Ort, Datum

Christin Rebecca Reinbach

Unterschrift Doktorandin

VII. Danksagung

Die Verfassung einer Dissertation erfordert Fleiß, Durchhaltevermögen und vor Allem die Expertise und Unterstützung von Anderen. Am Schluss meiner Arbeit möchte ich gerne den Menschen danken, die diese Arbeit ermöglicht und unterstützt haben.

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp, für die Betreuung meiner Promotion. Zuerst bedanke ich mich für seine professionelle Unterstützung, konstruktiven Anregungen und unerschöpfliches Feedback bei fachlichen Nachfragen und Korrekturen der Niederschriften. Außerdem bedanke ich mich für seinen lehrreichen Unterricht und sein wissenschaftliches Engagement, wodurch meine Eigeninitiative und mein Ehrgeiz gefördert wurde. Herr Professor Kipp stand mir während meiner gesamten Promotion mit ausgezeichnetem akademischem Rat zur Seite. Letztlich danke ich Herrn Professor Kipp für seine Unterstützung bei der Veröffentlichung von wissenschaftlichen Publikationen und der Ermöglichung meiner Teilnahme am MS Kongress der „Charcot Foundation“.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. Christoph Schmitz, dem Vorstand des Lehrstuhls Anatomie II – Neuroanatomie der Anatomischen Anstalt der LMU, dass ich meine Promotionsarbeit an seinem Lehrstuhl durchführen durfte und von allen Mitarbeitern unterstützt wurde.

Mein besondere Dank gilt Frau Professorin Tanja Hochstrasser, die mir als direkte Betreuerin meiner Promotion immer mit professionellem Rat und hilfreichen Tipps zur Seite stand. Für ihre unbegrenzte Geduld bei wissenschaftlichen Rückfragen und ihrer menschlichen Unterstützung bedanke ich mich sehr.

Des Weiteren bedanke ich mich ganz herzlich bei den technischen Assistentinnen des Lehrstuhls II der Anatomischen Anstalt, besonders bei Astrid Baltruschat, Beate Aschauer und Sarah Wübbel, für Ihre Unterstützung bei der Durchführung der Versuche, ihrer wissenschaftlichen Expertise und geduldigen Einarbeitung in verschiedene Labormethoden.

Ebenso bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden, die mir während dieser Dissertation und durch mein gesamtes Studium zur Seite standen und mich stetig unterstützt haben. Abschließend danke ich Alexander Zech ganz herzlich für seine unerschöpfliche Geduld, wertvollen Ratschläge und liebevolle Unterstützung.